



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

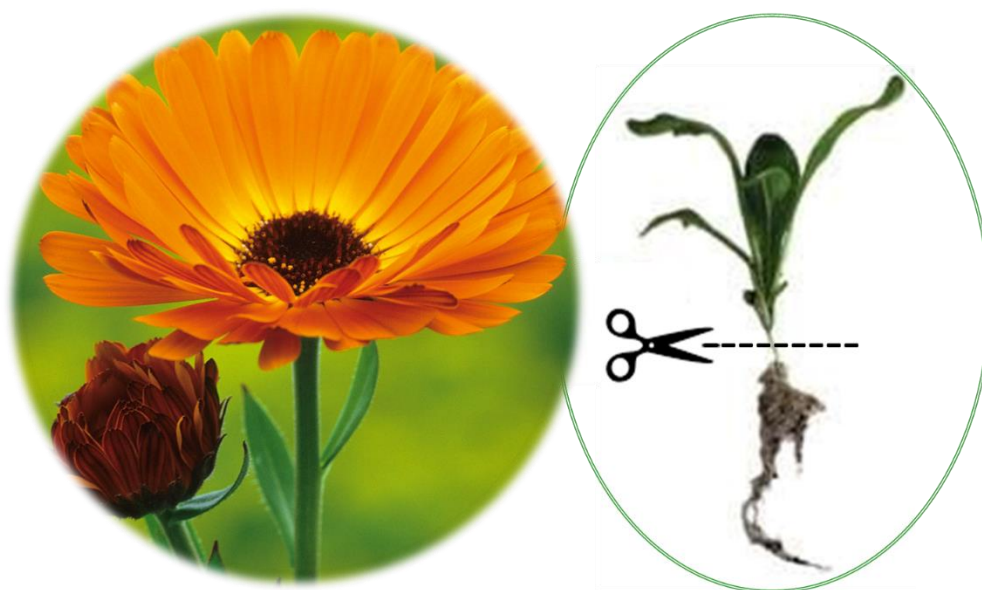
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Γενετικός μετασχηματισμός στο είδος *Calendula officinalis* L. με στόχο την ενίσχυση του βιοδραστικού δυναμικού»

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΣΑΜΑΡΑ



Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Αναπλ. Καθηγήτρια, Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ, 2024

**«Γενετικός μετασχηματισμός στο είδος *Calendula officinalis* L. με στόχο
την ενίσχυση του βιοδραστικού δυναμικού»**

**«Genetic transformation of *Calendula officinalis* L. to enhance its bioactive
potential»**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΣΑΜΑΡΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Πετρόπουλος Σπυρίδων, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Γιαννούλης Κυριάκος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, κα. Ουρανία Παυλή, επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας για την κριτική ανάγνωση του κειμένου, τις εύστοχες υποδείξεις της καθώς και την στήριξη της σε όλη την διαδικασία του πειράματος. Πραγματικά, είμαι πολύ χαρούμενη με την επιλογή μου να εκπονήσω την εργασία μου στο εργαστήριο Γενικής Βελτίωσης Φυτών.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα και μέλος του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών Τούμπου Χριστίνα για την βοήθειά της, τις πολύτιμες συμβουλές της στην διεξαγωγή όλων των μεθόδων που χρειάστηκε να ακολουθήσω και για την συμβολή της σε όλα τα στάδια του πειράματός μου.

Επίσης, τον κ. Σπυρίδωνα Πετρόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, και τον κ. Κυριάκο Γιαννούλη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους, για την αγάπη και την στήριξη που μου δείχνουν.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θέλω να το δώσω στην οικογένεια μου και ειδικότερα στους γονείς μου, Αναστασία και Αποστόλη, για την αγάπη, την στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλο το διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά αποτελούν το θεμέλιο στην ανάπτυξη πληθώρας φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται από τα αρχαία χρόνια έως και σήμερα, λόγω του περιεχομένου τους σε ενώσεις με λειτουργικές ιδιότητες. Εν όψει της αυξανόμενης ζήτησης για βιοδραστικά συστατικά φυτικής προέλευσης, και με δεδομένο ότι η καλλιέργειά τους δεν απαντά στην ζήτησή τους στην αγορά, οι νέες τεχνολογίες της βελτίωσης φυτών μπορούν να συνδράμουν καθοριστικά προς την αύξηση της παραγωγής τους. Συγκεκριμένα, οι εξελίξεις στις τεχνολογίες της ιστοκαλλιέργειας και της γενετικής μηχανικής έχουν ανοίξει νέους δρόμους για την αποτελεσματική παραγωγή επιθυμητών βιοδραστικών ενώσεων σε μεγάλη κλίμακα. Η καλέντουλα, με επιστημονική ονομασία *Calendula officinalis* L., αποτελεί φαρμακευτικό είδος, το οποίο έχει την ικανότητα σύνθεσης βιοδραστικών συστατικών με σημαντικές βιολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες που αποδίδονται στην επουλωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμυκητιακή, αντιβακτηριακή, γαστροπροστατευτική και αντικαρκινική τους δράση. Αντικείμενο τις πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου μετασχηματισμού του είδους *Calendula officinalis*, μέσω του βακτηριακού φορέα *Agrobacterium rhizogenes*, με στόχο την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων ριζών που είναι δυνητικά αξιοποιήσιμες σε διαδικασίες εξαγωγής δευτερογενών μεταβολιτών. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, των R1000 και A4, και τη χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων που είναι εμπλουτισμένα με μακροστοιχεία, μικροστοιχεία, σουκρόζη, καθώς και MES / ακετοσυρινγκόνη ως μέσα ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού. Τα συνολικά αποτελέσματα της έρευνας αναδεικνύουν τη σημαντική επίδραση του βακτηριακού στελέχους στις παραμέτρους που σχετίζονται με το μετασχηματισμό, όπως ο χρόνος σχηματισμού των νέων ριζών και η μορφολογία τους καθώς και η συχνότητα μετασχηματισμού. Σχετικά με το βακτηριακό στέλεχος, τα ευρήματα ανέδειξαν τη θετική επίδραση του στελέχους R1000, το οποίο οδήγησε σε ανάπτυξη νέων ριζών σε συντομότερο χρόνο και με αυξημένη βιομάζα συγκριτικά με το στέλεχος A4. Ειδικότερα, οι ρίζες που σχηματίστηκαν έπειτα από εμβολιασμό με το στέλεχος R1000 εμφάνισαν το φαινότυπο των θυссανώδων ριζών, που χαρακτηρίζεται από προηγμένη ικανότητα διακλάδωσης στο σημείο του εμβολιασμού, που συχνά περιλάμβανε και ανάπτυξη κάλλου, και περιστασιακή πλαγιοτροπική ανάπτυξη. Αντίθετα, τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος A4 σχημάτισαν ένα ριζικό σύστημα το οποίο δεν παρέκλινε φαινοτυπικά από αυτό των φυτών του αγρίου τύπου. Αναφορικά με την

αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας μετασχηματισμού, τα ευρήματα υποστηρίζουν τη θετική επίδραση του παράγοντα MES καθώς και των υψηλών συγκεντρώσεων σουκρόζης και ακετοσυριγκόνης στα θρεπτικά μέσα εμβολιασμού και ανάπτυξης των φυτών.

1. Εισαγωγή

1.1 Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά

Ο όρος αρωματικά φυτά χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια μεγάλη ομάδα ειδών του φυτικού βασιλείου με κοινό γνώρισμα την περιεκτικότητα σε ένα τμήμα (φύλλα, άνθη, βλαστούς κλπ) ή σε ολόκληρο το φυτό, πτητικών χημικών ουσιών, τα αιθέρια έλαια. Τα αιθέρια έλαια αναδύουν ευχάριστο άρωμα και προσδίδουν στα αρωματικά φυτά ευχάριστη γεύση και οσμή, καθιστώντας τα ιδανική πρώτη ύλη για χρήση στην αρωματοποιία και στη μαγειρική. Στην ομάδα των φαρμακευτικών φυτών κατατάσσεται κάθε φυτό που εμπεριέχει ένα ή περισσότερα δραστικά συστατικά, τα οποία φέρουν ιδιότητες πρόληψης, ανακούφισης ή ίασης ασθενειών. Η χρήση του όρου «αρωματικά - φαρμακευτικά φυτά» είναι προσδιοριστική των φαρμακευτικών τους ιδιοτήτων, ενώ και τα φαρμακευτικά φυτά είναι συνήθως αρωματικά. Κοινό χαρακτηριστικό των αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών είναι η ύπαρξη των αιθέριων ελαίων (Φερτάκη, 2011).

Η περιοχή της Μεσογείου αποτελεί μία θερμή ζώνη βιοποικιλότητας ("biodiversity hotspot"), καθώς φιλοξενεί πληθώρα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ιδιαίτερη γεωγραφική θέση της, την γεωμορφολογία της, στις εδαφοκλιματικές συνθήκες που επικρατούν καθώς και στην αλληλεπίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Μεταξύ των χωρών της Μεσογείου, η Ελλάδα αποτελεί μία περιοχή υψηλής φυτικής ποικιλότητας και ενδημισμού, γεγονός που την τοποθετεί ανάμεσα στις πλέον κατάλληλες περιοχές καλλιέργειας των εν λόγω ειδών.

Ειδικότερα, η Ελλάδα, λόγω των ευνοϊκών εδαφοκλιματικών συνθηκών της, παρουσιάζει μία από τις πλουσιότερες χλωρίδες του πλανήτη που περιλαμβάνει πολυάριθμα φαρμακευτικά φυτά. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, από τα 6.308 είδη ανώτερων φυτών που εντοπίζονται στον ελλαδικό χώρο, τα 500 – 600 είδη είναι φαρμακευτικά φυτά. Σύμφωνα με στοιχεία της Διεύθυνσης της Αγροτικής Πολιτικής και Τεκμηρίωσης του ΥπΑΑΤ, τα περισσότερα συνήθη καλλιεργούμενα φαρμακευτικά είδη στην Ελλάδα είναι η ρίγανη (*Origanum vulgare*), ο δίκταμος (*Origanum dictamnus*), το τσάι του βουνού (*Sideritis* sp.) και το χαμομήλι (*Chamomilla* sp.) (Stephanou *et al.*, 2015). Μεταξύ των πλέον εμπορεύσιμων αρωματικών ειδών που απαντώνται στην Ελλάδα συγκαταλέγονται η μέντα, η λεβάντα, το χαμομήλι και το βάλσαμο.

1.2 Αξία των φαρμακευτικών φυτών

Η εξάρτηση των ανθρώπων από τα φυτά χρονολογείται από την έναρξη της εμφάνισης του ανθρώπινου είδους, προκειμένου να καλύψει βασικές ανάγκες ή/και να εξασφαλίσει την επιβίωση του. Μάλιστα, αναφέρεται ως γεγονός ότι χωρίς τα φυτά δεν θα υπήρχε ζωή στον πλανήτη Γη. Είναι δε αξιοσημείωτο ότι, ήδη από την αρχαιότητα, τα φυτά δεν χρησιμοποιήθηκαν μόνο για την κάλυψη των αναγκών διατροφής, στέγης, και ρουχισμού, αλλά και για την αντιμετώπιση ασθενειών (Aslam and Ahmad, 2016).

Από τα αρχαία χρόνια οι άνθρωποι αναζητούσαν φάρμακα στη φύση για την ίαση ποικίλων ασθενειών. Βέβαια, η αρχή της χρήσης των φαρμακευτικών φυτών ήταν ενστικτώδης και βασίζονταν στην εμπειρία και στην παρατήρηση ότι η χρήση συγκεκριμένων φυτών προσφέρει ανακούφιση ή/και θεραπευτικά οφέλη. Σταδιακά, άρχισαν να ανακαλύπτονται οι λόγοι για τη χρήση συγκεκριμένων φυτών στην θεραπεία των ασθενειών, ενώ μέχρι την έλευση της ιατροχημείας τον 16^ο αιώνα τα φυτά αποκλειστικά αποτελούσαν την πηγή θεραπείας.

Αρχαιολογικά ευρήματα αποδεικνύουν πως η χρήση συγκεκριμένων φυτών ξεκίνησε από την Παλαιολιθική Εποχή, ενώ η παλαιότερη γραπτή μαρτυρία για την παρασκευή φυτικών φαρμάκων έχει βρεθεί σε μια πλάκα των Σουμέριων, η οποία χρονολογείται πάνω από 5000 χρόνια. Αυτή περιλάμβανε 12 συνταγές για την παρασκευή βοτάνων που αναφέρονταν σε περισσότερα από 250 φυτά. Ακόμη, αναφορές και μελέτες, τόσο σε κινέζικα και ιερά ινδικά βιβλία όσο και σε έργα Αρχαίων Ελλήνων και Ρωμαίων, μιλούν για την αξία των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Τα φαρμακευτικά φυτά αποτελούν το θεμέλιο των εξελιγμένων συστημάτων παραδοσιακής ιατρικής μεταξύ των οποίων είναι η Αγιουρβέδα, η Ουνάνι και η Κινέζικη (Halberstein, 2005).

Στον αρχαίο δυτικό κόσμο, οι Έλληνες συνείσφεραν, σημαντικά στην ορθολογική ανάπτυξη της χρήσης φυτικών φαρμάκων. Το ευρωπαϊκό θεραπευτικό σύστημα λέγεται ότι άρχισε από τον Ιπποκράτη (460–377 π.Χ.) και τον Αριστοτέλη (384–322 π.Χ.), των οποίων οι ιδέες είχαν τα θεμέλια τους σε θεραπευτικά συστήματα από την Ινδία και την Αίγυπτο. Ο φιλόσοφος και φυσικός επιστήμονας Θεόφρατος (~300 π.Χ.), στο έργο του "History of Plants", ασχολήθηκε με τις φαρμακευτικές ιδιότητες και τα βότανα. Ο Διοσκουρίδης, Έλληνας γιατρός (100 μ.Χ.), κατά τη διάρκεια των ταξιδιών του με τους ρωμαϊκούς στρατούς, ασχολήθηκε με τη συλλογή, αποθήκευση και χρήση των φαρμακευτικών βοτάνων. Τέλος, ο Γαληνός (130–200 μ.Χ.) δίδαξε τη φαρμακευτική και την ιατρική στη Ρώμη, δημοσιεύοντας τουλάχιστον 30 βιβλία,

ενώ είναι πολύ γνωστός για τις συνταγές που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση φαρμάκων («γαληνικά»).

Μέχρι και σήμερα, η παραδοσιακή ιατρική που στηρίζεται στη χρήση φυτών, συνεχίζει να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σύστημα υγειονομικής περίθαλψης. Έτσι, παρατηρείται η αύξηση της ζήτησης σε παγκόσμιο επίπεδο των φαρμάκων και προϊόντων υγείας, των καλλυντικών και των συμπληρωμάτων διατροφής φυτικής προέλευσης. Μάλιστα, το ένα τέταρτο όλων των φαρμάκων που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι σκευάσματα που έχουν ως βάση ουσίες που προέρχονται από φυτά ή συστατικά ανάλογα φυτικής προέλευσης. Ταυτόχρονα, σύμφωνα με τον ΠΟΥ, το 80 % του παγκόσμιου πληθυσμού βασίζει την υγειονομική του περίθαλψη σε φάρμακα παρασκευασμένα από φυτά (Gubik-Fakim, 2006).

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά διαχρονικά αποτελούν αντικείμενο εμπορίου με σημαντική οικονομική δυναμική, όμως η αξία τους επηρεάστηκε με τη παρασκευή και χρήση σύνθετων χημικών φαρμακευτικών υλικών. Παρά την επικράτηση των συνθετικών σκευασμάτων στην αγορά για αρκετές δεκαετίες, τα τελευταία χρόνια εκδηλώνεται έντονα η τάση για την αντικατάσταση των χημικών ουσιών από συστατικά φυτικής προέλευσης σε βιομηχανίες παρασκευής τροφίμων και ποτών, καλλυντικών αλλά και φαρμάκων. Η τάση αυτή αποτυπώνεται και στην κατανάλωση και χρήση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, η οποία την τελευταία δεκαετία στη Δυτική Ευρώπη έχει διπλασιαστεί. Συγκεκριμένα, στην Ευρώπη διακινούνται τουλάχιστον 2.000 είδη στο εμπόριο, ενώ αντίστοιχα τα τελευταία χρόνια είναι εμφανής η αυξητική τάση και σε Ινδία και Κίνα, χώρες οι οποίες συνιστούν κοιτίδες της παραδοσιακής ιατρικής.

Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η χρήση της παραδοσιακής ιατρικής αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της κουλτούρας, ενώ παράλληλα συνεισφέρει στην κοινωνική και οικονομική ευημερία της κοινότητας. Παράλληλα, το σύστημα της παραδοσιακής ιατρικής συμβάλλει στην κάλυψη των αναγκών της πρωτοβάθμιας φροντίδας της υγείας στις περιοχές του αναπτυσσόμενου κόσμου, ενώ παρατηρείται η ραγδαία εξάπλωσή του και στις βιομηχανικές χώρες. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει εκπονήσει μια Στρατηγική Παραδοσιακής Ιατρικής με στόχο την ορθολογική χρήση της παραδοσιακής ιατρικής, με τις προσεγγίσεις αυτής να αναφέρονται ως συμπληρωματικές ή εναλλακτικές. Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, ισχύουν τα ακόλουθα:

- Στις Βιομηχανικές Χώρες -Βόρεια Αμερική και Ευρώπη-, το 50 % του πληθυσμού έχει χρησιμοποιήσει σκευάσματα εναλλακτικής ιατρικής τουλάχιστον 1 φορά στη ζωή του

- Στη Κίνα, τα παραδοσιακά φυτικά σκευάσματα ανέρχονται στο 30-50 % του συνόλου των φαρμάκων
- Η παγκόσμια αγορά των φυτικών φαρμάκων ανέρχεται σε περισσότερο από 60 δισεκατομμύριο δολάρια ετησίως και παρουσιάζει σταθερή αυξητική τάση (Ghorbanpour *et al.*, 2017).

Με δεδομένη την αναμενόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, καθώς και την παρατηρούμενη στροφή των καταναλωτών προς τη χρήση προϊόντων φυτικής προέλευσης, τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά έχουν ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον και αδιαμφισβήτητα τίθενται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Στο επίπεδο αυτό, σημειώνεται ότι ένα μεγάλο μέρος των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών παραμένει ανεξερεύνητο, ενώ ταυτόχρονα πληθώρα ειδών διαθέτουν ευεργετικές ιδιότητες που δεν έχουν ακόμη ανακαλυφθεί.

Μεταξύ των προϊόντων φυτικής προέλευσης που έχουν αναπτυχθεί και διατίθενται στην αγορά, ως πλέον χρησιμοποιούμενα από το καταναλωτικό κοινό αναφέρονται τα ακόλουθα:

- Αιθέρια Ελαία: προσφέρουν ιδιαίτερες αρωματικές, γευστικές αλλά και βιολογικές ιδιότητες. Χρησιμοποιούνται στην αρωματοθεραπεία, αλλά κατά κύριο λόγο βρίσκουν εφαρμογή σε προϊόντα υγιεινομικής περίθαλψης.
- Φαρμακευτικά προϊόντα – Φυτικά φάρμακα: περισσότερο από το 25% των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σήμερα προέρχονται κυρίως από υλικά φυτικής προέλευσης. Μεταξύ των φυτικών μερών που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή φυτικών φαρμάκων συγκαταλέγονται διάφορα όργανα και ιστοί, όπως η ρίζα, ο φλοιός, το άνθος, ο σπόρος, ο καρπός και ο βλαστός.
- Φυτικά συμπληρώματα διατροφής: με δεδομένο ότι τα φυτά αποτελούν πολύτιμη πηγή βιταμινών, ιχνοστοιχείων και μετάλλων, ένα σημαντικό μερίδιο αυτών χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για παρασκευή πληθώρας σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται για την κάλυψη των σχετικών αναγκών του οργανισμού.
- Καλλωπιστικά προϊόντα: μεταξύ των σημαντικών συστατικών των φυτών που συνεισφέρουν στην παρασκευή των καλλυντικών είναι τα έλαια, τα λίπη, οι ελαιορητίνες, οι χρωστικές και τα φυτικά εκχυλίσματα.
- Φυτοπροστατευτικά προϊόντα: είναι ευρέως γνωστό ότι τα ίδια τα φυτά συνιστούν πολύτιμη πηγή φυτοπροστατευτικών προϊόντων έναντι των εντόμων, ζιζανίων αλλά και μικροοργανισμών. Το χημικό οπλοστάσιο των φυτών έναντι εχθρών και ασθενειών

αποτελεί το αποτέλεσμα της συνεξέλιξής τους με το περιβάλλον ανάπτυξής τους, πορεία η οποία έχει οδηγήσει στον εμπλουτισμό τους με πολυάριθμες αμυντικές ενώσεις.

1.3 Προοπτικές εμπορικής αξιοποίησης των φαρμακευτικών φυτών

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην βιοποικιλότητα πολλών χωρών στον πλανήτη. Αυτά τα είδη συνεισφέρουν σημαντικά στην υγειονομική περίθαλψη, στην πολιτιστική κληρονομιά, στην οικονομία, καθώς και στην ευημερία των κοινωνιών. Παρά τον αναγνωρισμένο ρόλο των φαρμακευτικών φυτών, η έρευνα στερείται συστηματικών μελετών σχετικά με τις προοπτικές αξιοποίησής τους αλλά και μελετών σχετικά με διατήρηση ή/και διάσωση των ειδών που απειλούνται με εξαφάνιση. Ο κίνδυνος για τη μείωση της γενετικής ποικιλότητας στα εν λόγω είδη είναι αυξανόμενος αφενός μεν λόγω της έλλειψης προστατευμένων οικότοπων και αφετέρου λόγω της ανεξέλεγκτης εκμετάλλευσής τους. Παράλληλα, είναι σαφώς περιορισμένη η κατανόηση των αναγκών σχετικά με την αειφόρο και βιώσιμη διαχείριση των φυσικών πόρων. Στο πλαίσιο αυτό, ως άμεσος στόχος τίθεται η επίτευξη ισορροπίας μεταξύ της χρήσης και της διατήρησης των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Προς την κατεύθυνση αυτή, αναφέρεται ως επιτακτική η στροφή προς μια γεωργία που χρησιμοποιεί φυσικούς πόρους που έχουν ως θεμέλιο την παγκοσμιοποίηση των οικονομιών (Padulosi *et al.*, 2002).

Μέσα από διάφορες φαρμακολογικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τα φαρμακευτικά φυτά κατέχουν ιδιαίτερες ευεργετικές και βιολογικές ιδιότητες, οι οποίες αποτελούν την επιστημονική βάση για την χρήση αυτών στην παραδοσιακή ιατρική από την εποχή της αρχαιότητας (Hussein and El-Anssary, 2019). Οι δραστικές ενώσεις, που σχηματίζονται ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, είναι υπεύθυνες για τις βιολογικές ιδιότητες ορισμένων φυτικών ειδών που χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της ίασης ασθενειών (Silvia and Fernandes Junior, 2010).

1.4 Δευτερογενείς Μεταβολίτες στα Φαρμακευτικά Φυτά

Τα φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρώτες ύλες στη φαρμακοβιομηχανία. Η φαρμακολογική δράση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών οφείλεται στη σύνθεση βιοδραστικών συστατικών, που είναι κατά βάση δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι δευτερογενείς

μεταβολίτες αποτελούν τελικά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών που δε βρίσκονται σε αφθονία, αλλά απαντώνται σε περιορισμένες ποσότητες σε σχέση με τα προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού, όπως οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συνιστούν ένα σύνολο αντιμικροβιακών, αντιμυκητιακών και αντιβιοτικών χημικών ουσιών που συμβάλλουν στην προστασία των φυτών από τις καταπονήσεις που επικρατούν στο περιβάλλον ανάπτυξής τους, ενώ παράλληλα διαθέτουν λειτουργικές ιδιότητες που δρουν ευεργετικά στην ανθρώπινη υγεία.

Χαρακτηριστικό της σύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών είναι ότι δεν απαντώνται σε ολόκληρο το φυτό, αλλά εντοπίζονται σε εξειδικευμένα μέρη του φυτού και εξυπηρετούν σημαντικές λειτουργίες. Ανάλογα με το σημείο σύνθεσης και εντοπισμού των βιοδραστικών συστατικών, τα φυτικά μέρη ταξινομούνται σε 4 διαφορετικούς τύπους ιστών ή οργάνων, ως ακολούθως: (1) ρίζες και μίσχοι, (2) φύλλα, (3) άνθη, (4) καρποί και σπόροι (Li *et al.*, 2020).

Οι κυριότερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών με σημαντική αντιμικροβιακή δράση είναι τα αλκαλοειδή, τα φαινολικά και τα τερπενοειδή (Pant *et al.*, 2021). Πρόκειται για ουσίες που δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του φυτού, αλλά δρουν ως αμυντικές ενώσεις που αλληλοεπιδρούν για την προσαρμογή των φυτών με το περιβάλλον. Τα αλκαλοειδή αποτελούν πολύπλοκα φυσικά προϊόντα και χρησιμοποιούνται ως αντιβηχικά, ηρεμιστικά και καθαρτικά. Οι βιολογικές δράσεις των τερπενίων σχετίζονται με την αντιμετώπιση του καρκίνου, της ελονοσίας, της φυματίωσης και άλλων μολυσματικών ασθενειών. Τέλος, τα φαινολικά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά ως αντικαρκινικά, καρδιοπροστατευτικά, αντιφλεγμονώδη και συμβάλλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Christaki *et al.*, 2012).

1.5 Προβλήματα και Προκλήσεις

Τα φαρμακευτικά φυτά αποτελούν σημαντικές πηγές φυτικών προϊόντων παγκοσμίως και εξαφανίζονται με ιδιαίτερο έντονο ρυθμό. Στην Ευρώπη, χρησιμοποιούνται περισσότερα από 1300 φυτά, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες το 80 % των ανθρώπων εμφανίζει εξάρτηση από τα φυτικά φάρμακα για την πρωτοβάθμια περίθαλψη. Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, η υφιστάμενη απώλεια ειδών είναι 100-1000 φορές μεγαλύτερη από τον αναμενόμενο ρυθμό και έτσι χάνεται 1 πιθανό φάρμακο κάθε 2 χρόνια. Η αλόγιστη εκμετάλλευση και συλλογή των φυτικών ειδών, η καταστροφή των οικοτόπων και η ανεξέλεγκτη αποψίλωση των δασών

αποτελούν κινδύνους για την διαθεσιμότητα των φυσικών πόρων (Chen *et al.*, 2016). Σύμφωνα με τα ανωτέρω, είναι προφανές ότι η χρήση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών μέσω της συλλογής θα πρέπει να συμμορφώνεται με το πλαίσιο της αειφορίας, ειδικά ελλοχεύει ο κίνδυνος της μείωσης ή ακόμη και της εξαφάνισης πολύτιμων φυτικών ειδών (Stephanou *et al.*, 2015).

Η διαθέσιμη χλωρίδα δεν αξιοποιείται ευρέως και έτσι δεν παρατηρείται εξέλιξη στον τομέα της καλλιέργειας των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Αυτό αποτελεί κατά βάση συνέπεια της έλλειψης επαρκών γνώσεων και εμπειρίας αναφορικά με τα πρακτικά ζητήματα του τρόπου καλλιέργειας των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών και τα ζητήματα προώθησης. Η οργάνωση μιας καλλιέργειας αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών θα πρέπει να τηρεί κάποιους κανόνες. Αρχικά, πρέπει να προηγείται η έρευνα αγοράς πριν την εγκατάσταση καλλιέργειας, ώστε ο καλλιεργητής να γνωρίζει τα φυτικά είδη που έχουν ζήτηση από το καταναλωτικό κοινό. Επίσης, η κατεργασία των προϊόντων των εν λόγω φυτικών ειδών θα πρέπει να γίνεται με μηχανικά μέσα για την καλύτερη ποιότητα τους. Ένα επιπλέον πρόβλημα που προκύπτει κατά την εμπορική αξιοποίηση των αρωματικών και φαρμακευτικών ειδών σχετίζεται με τη δυνατότητα επεξεργασίας των προϊόντων τους, καθώς οι σχετικές μονάδες είναι περιορισμένες. Είναι δε αξιοσημείωτο, ότι στο πλείστο των περιπτώσεων οι μονάδες επεξεργασίας τροφοδοτούνται με πρώτες ύλες που εισάγονται από χώρες του εξωτερικού, με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται η ποιότητα.

Περαιτέρω, σημαντικότατο πρόβλημα αποτελεί η έλλειψη πιστοποιημένου σπόρου και πολλαπλασιαστικού υλικού. Η επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος, αδιαμφισβήτητα απαιτεί τη διεξαγωγή συστηματικών ερευνών για τη βελτίωση του γενετικού υλικού με σκοπό την δημιουργία αποδοτικότερων ποικιλιών. Στο πλαίσιο αυτό, η ενίσχυση των στρεμματικών αποδόσεων, η σταθεροποίηση των γνωρισμάτων ποιότητας και η αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες αποτελούν τους κύριους βελτιωτικούς στόχους.

1.6 Το είδος *Calendula officinalis*

Η καλέντουλα, με επιστημονική ονομασία *Calendula officinalis*, είναι αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό που ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae* και ενδημεί στην Νότια, Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη. Η ονομασία του φυτού προέρχεται από τη λατινική λέξη *calends*, που μεταφράζεται ως η πρώτη μέρα του κάθε μήνα και σχετίζεται με τις περιόδους ανθοφορίας του

φυτού. Η περίοδος ανθοφορίας της καλέντουλας στην Ευρώπη είναι από τον Ιούνιο έως τον Σεπτέμβριο.

Το φυτό μεταφέρθηκε στην Αγγλία τον 13^ο αιώνα και ακολούθως εξαπλώθηκε σε όλη την Ευρώπη. Η φαρμακευτική και θεραπευτική δράση του φαίνεται να έγινε αντιληπτή μετά τον 12^ο αιώνα και συνδέεται κυρίως με την αντιμετώπιση των πληγών. Κατά τη διάρκεια του εμφυλίου πολέμου της Βόρειας Αμερικής και του Πρώτου Παγκοσμίου Πολέμου, το φυτό χρησιμοποιήθηκε σαν αντισηπτικό και σαν αντιφλεγμονώδες για την επούλωση των πληγών του δέρματος.

Η καλέντουλα έχει καλλιεργηθεί από Αιγύπτιους, Άραβες, Ινδουιστές και Έλληνες, με την καλλιέργειά της να σχετίζεται με το γεγονός ότι, στην Ευρώπη, η χρήση της ιατρικούς λόγους χρονολογείται ήδη από τον 12^ο αιώνα. Πληθυσμοί καλέντουλας εντοπίζονται στην περιοχή της Μεσογείου και στη Μέση Ανατολή. Επί του παρόντος, αποτελεί ένα διαδεδομένο φυτικό είδος που καλλιεργείται για ιατρικούς και διακοσμητικούς σκοπούς στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική.

1.6.1. Βοτανική περιγραφή

Η καλέντουλα αποτελεί ένα αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό με μονοετές ή διετές κύκλο ανάπτυξης. Η ετήσια μορφή είναι ευρύτερα καλλιεργούμενη. Το φυτό φτάνει σε ύψος μεταξύ 30 και 60 cm και διαθέτει περίπου 20 cm μακριά κεντρική ρίζα με πολλές λεπτές, δευτερεύουσες ρίζες (Εικόνα 1.1).

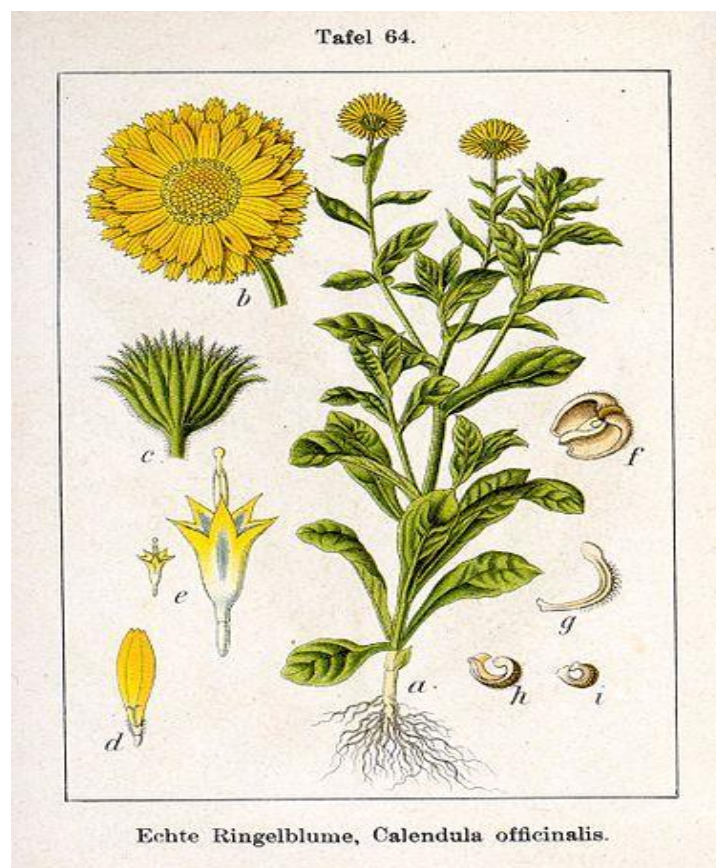
Ο βλαστός του φυτού είναι ανορθωμένος, γωνιώδης, με βελούδινη υφή και διακλαδισμένος από τη βάση προς τα πάνω, έχοντας μεσοπράσινο χρώμα (Εικόνα 1.1). Πάνω στο στέλεχος φύονται τα εναλλασσόμενα φύλλα με μήκος έως 10 cm και πλάτος 1-4 cm. Τα φύλλα είναι σχεδόν στρογγυλεμένα στη βάση, επιμήκη έως λογχοειδή σε σχήμα σπάτουλας. Τα κάτω φύλλα του φυτού έχουν πιο πεπλατυσμένα, ενώ τα πάνω φύλλα έχουν μικρότερο μέγεθος και πιο μυτερό σχήμα (Khalid *et al.*, 2012). Όλα τα μέρη του φυτού καλύπτονται με αδενώδεις τρίχες, οι οποίες αποτελούν μια πολυκυτταρική δομή στην οποία παράγεται το αιθέριο έλαιο.

Στην κορυφή κάθε βλαστού, απαντάται ένα σύνθετο άνθος κίτρινο-πορτοκαλί με πλάτος κεφαλής 5-7 cm, το οποίο περιβάλλεται από δύο σειρές πολυάριθμων στενών πράσινων σέπαλων, τα οποία διαθέτουν βελούδινη υφή και στις δύο πλευρές. Στο εσωτερικό τμήμα της κεφαλής των λουλουδιών, βρίσκονται πορτοκαλοκίτρινα σωληνοειδή πέταλα (Εικόνα 1.1). Τα

κεφάλια των λουλουδιών είναι ετερόγαμα, δηλαδή τα εξωτερικά άνθη είναι θηλυκά ενώ τα εσωτερικά είναι άνθη δίσκου είναι ψευδοερμαφρόδιτα και στείρα θηλυκά.

Το άνθος αποτελείται από ακτινωτά ανθύλλια (ray florets) και από ανθύλλια του δίσκου (disc florets). Τα ανθύλλια του δίσκου είναι σωληνοειδή και ψευδο-ερμαφρόδιτα με πιο έντονο πορτοκαλί χρώμα μήκος 5-12 cm με χνούδι και στις δύο πλευρές, ενώ τα θηλυκά ακτινωτά ανθύλλια είναι στείρα. Τα ζυγόμορφα άνθη στην άκρη είναι θηλυκά, οι στήμονές τους απουσιάζουν εντελώς και οι κάτω ωοθήκες τους είναι περισσότερο ανεπτυγμένες συγκριτικά με αυτές των ανθυλλίων του δίσκου.

Ο σπόρος σχηματίζεται μόνο στα θηλυκά λουλούδια και είναι αγκαθωτό καμπυλωτό αχάινιο (Εικόνα 1.1). Το αχάινιο αποτελεί τον μονόσπερμο, ξηρό καρπό που προκύπτει από μονόχωρη ωοθήκη, ενώ έχει γκρι ή ανοιχτό καφέ χρώμα (Ashwlayan *et al.*, 2018).



Εικόνα 1.1 Μορφολογία φυτού *Calendula officinalis*. a. βλαστός με φύλλα και άνθη, b. άνθος, c. σέπαλα, d. ακτινωτό ανθύλλιο, e. ανθύλλιο του δίσκου f. καρπός αχάινιο, και h. σπόρος.

1.6.2 Αύξηση και Ανάπτυξη

Η καλέντουλα αποτελεί ένα φυτό με μονοετή κύκλο ανάπτυξης και ανθίζει από τον Μάιο μέχρι τον Οκτώβριο. Το φυτό πολλαπλασιάζεται με σπόρο. Είναι απαραίτητη η δημιουργία σπορόφυτων και αργότερα η εγκατάστασή τους στον αγρό, προκειμένου να ανταπεξέλθουν τα φυτά σε σχέση με τον ανταγωνισμό με τα ζιζάνια στον αγρό. Η μεταφορά των σπορόφυτων από το σπορείο στον αγρό γίνεται όταν τα σπορόφυτα έχουν φτάσει στο στάδιο των 3-4 πραγματικών φύλλων.

Το φυτό καλλιεργείται για το άνθος, τον ελαιούχο σπόρο και τα φύλλα του. Όταν ενδιαφέρει η εκμετάλλευση των φύλλων, η συγκομιδή τους θα πρέπει να γίνεται στο στάδιο της πλήρους άνθησης, διότι σε αυτό το στάδιο είναι μεγαλύτερη η απόδοση σε αιθέριο έλαιο (Okoh *et al.*, 2007).

Το φυτό αναπτύσσεται στα περισσότερα κλίματα με ιδανικές θερμοκρασίες άνω των 18°C. Το άριστο pH εδάφους κυμαίνεται από 6 έως 7. Είναι απαραίτητες οι αρδεύσεις αμέσως μετά την εγκατάσταση, κυρίως κατά την περίοδο του καλοκαιριού, όταν δεν υπάρχουν πλέον αρκετές βροχές.

1.6.3. Φυτοχημικό προφίλ

Η καλέντουλα αποτελεί ένα αρωματικό βότανο που χρησιμοποιείται στη παραδοσιακή ιατρική εδώ και αιώνες. Ως αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό περιέχει ένα σύνολο χημικών ουσιών με λειτουργικές ιδιότητες (Patil *et al.*, 2022). Μέσω της ανάλυσης του φυτοχημικού προφίλ, που περιλαμβάνει τη δομική ανάλυση, χημική σύνθεση και τα χαρακτηριστικά των μακρομορίων, προκύπτει ότι η καλέντουλα διαθέτει πολλές κατηγορίες χημικών ενώσεων, με κυριότερες τα φλαβονοειδή, τα τερπενοειδή, τα καροτενοειδή, τις κινόνες, το πτητικό έλαιο και τις κουμαρίνες (Πίνακας 1.1). Επίσης, περιέχει και άλλα συστατικά, όπως λιπίδια, αμινοξέα και υδατάνθρακες (AshwlayanVD *et al.*, 2018).

Το φυτό έχει υψηλά επίπεδα καροτενοειδών στο άνθος του, που προσδίδουν το έντονο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα. Ακόμη τα λιπαρά οξέα, τα εκχύλισμα χλωροφορμίου, τα τριτερπένια και οι στερόλες βρίσκονται στο εκχύλισμα των φύλλων της καλέντουλας. Τα τερπενοειδή απομονώθηκαν από το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα από άνθη της καλέντουλας. Το 5 % των αμινοξέων εντοπίστηκε στα φύλλα, το 3,5 % στους μίσχους και το 4,5 % στα άνθη.

Μερικά από τα τερπενοειδή που απομονώθηκαν είναι οι σιτοστερόλες, οι στιγμαστερόλες, οι διεστέρες διολών, η ερυθροδιόλη, η λουπεόλη και η ψ-ταραξαστερόλη. Ορισμένα από τα σημαντικότερα φλαβονοειδή είναι η ναρκισσίνη, η ρουτίνη, η σοκερσετίνη, η ισοκερκιτρίνη, η καλεντοφλασίδη, η καλεντοφλαβοσίδη, η νεοεσπεριδοσίδη, η σοκουερσετίνη και τέλος η Ισοραμνετίνη-3-O-β-D-γλυκοσίδη. Μερικές από τις κουμαρίνες που απομονώθηκαν είναι η σκοπολετίνη, η εσκουτελίνη και η ουμπελιφερόνη. Κάποιες από τις κυρίες κινόνες είναι η α-τοκοφερόλη, η ουβικινόνη, η φυλλοκινόνη και η πλαστοκινόνη. Τέλος, τα καροτενοειδή που συντίθενται στην καλέντουλα περιλαμβάνουν παράγωγα νεοξανθίνης, λυκοπενίου, λουτεΐνης και καροτίνης (Abdelwahab *et al.*, 2022).

Πίνακας 1.1 Κυριότεροι δευτερογενής μεταβολίτες που απαντώνται στο είδος *Calendula officinalis*, η χημική ομάδα στην οποία ανήκουν και ο ιστός στον οποίο συναντώνται (Ashwlayan *et al.*, 2018).

ΧΗΜΙΚΗ ΟΜΑΔΑ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΕΙΔΟΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ
Τερπενοειδή	Σιτοστερόλες στιγμαστερόλες διεστέρες διολών ψ-ταραξαστερόλη λουπεόλη ερυθροδιόλη 3-O-παλμιτική φαραδιόλη	
Φλαβονοειδή	ναρκισσίνη ρουτίνη σοκερσετίνη ισοκερκιτρίνη καλεντοφλασίδη καλεντοφλαβοσίδη νεοεσπεριδοσίδη σοκουερσετίνη	
Κουμαρίνες	σκοπολετίνη εσκουτελίνη ουμπελιφερόνη	Άνθη
Κινόνες	Πλαστοκινόνη φυλλοκινόνη α-τοκοφερόλη	Χλωροπλάστες
	ουβικινόνη φυλλοκινόνη τοκοφερόλη	Μιτοχόνδρια
	φυλλοκινόνη	Φύλλα

Πτητικό έλαιο Μονοτερπένια Σεσκιτερπένια	α-καδινένιο α-καδινόλη τ-μουουρολόλη λιμονένιο	Άνθη
Καροτενοειδή	Νεοξανθίνη Λουτεΐνη	Πέταλα
	Λυκοπένιο	Φύλλα
	α-καροτένιο β-καροτένιο	Γύρη
Λιπίδια	Ελαικό οξύ Λινελαϊκό οξύ Λινολενικό οξύ	Σπόροι Φύλλα Άνθη
Αμινοξέα	Αλανίνη αργινίνη ασπαρτικό οξύ ασπαραγίνες βαλίνη ιστιδίνη γλουταμινικό οξύ λευκίνη λυσίνη προλίνη σερίνη, τυροσίνη θρεονίνη μεθειονίνη και φαινυλαλανίνη	Φύλλα Στελέχη Άνθη
Υδατάνθρακες	πολυσακχαριτών, PS-I,-II και III	Άνθη

1.6.4 Χρήσεις

Είναι γνωστό ότι η ιστορία των παραδοσιακών φαρμάκων είναι τόσο παλιά όσο και η ιστορία των πρώτων ανθρώπων. Η καλέντουλα αποτελεί ένα δημοφιλές καλλιεργούμενο αρωματικό φυτό, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί από τα παλαιά χρόνια στη μαγειρική, αλλά αποτελεί

ταυτόχρονα και σημαντικό είδος που χρησιμοποιήθηκε στην παραδοσιακή ιατρική με στόχο την καταπολέμηση ασθενειών. Ταυτόχρονα έχει καλλωπιστική αξία, εξαιτίας των όμορφων ανθέων με κίτρινο-πορτοκαλί χρωματισμό. Επίσης, το φυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως χρωστική ουσία, διότι περιέχει τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή, τα οποία προσδίδουν κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα αντίστοιχα.

Η φαρμακολογική δράση του φυτού σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε διάφορες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, με κυριότερες τα τερπενοειδή, τα φλαβονοειδή, τις κουμαρίνες, τις κινόνες, το πτητικό έλαιο και τα αμινοξέα που απαντώνται σε αφθονία στο φυτό. Η κυριότερη χρήση των ανθέων και των φύλλων της καλέντουλας είναι η φαρμακευτική, σύμφωνα με το σύστημα ιατρικής της Αγιουρβέδα και του Ουνάνι. Τα συστήματα ιατρικής Ayurvedic και Unani δηλώνουν ότι το φύλλο και το άνθος του φυτού έχουν αντιπυρετική, αντιεπιληπτική και αντιβακτηριακή δράση. Το φυτό περιλαμβάνεται στις μονογραφίες της Γερμανικής Επιτροπής E, του Ευρωπαϊκού Επιστημονικού Συνεταιρισμού για τη Φυτοθεραπεία, της Βρετανικής Βοτανικής Φαρμακοποιίας και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για επούλωση πληγών και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Ak *et al.*, 2021).

Σύμφωνα με φαρμακολογικές έρευνες, τα θεραπευτικά χαρακτηριστικά του φυτού σχετίζονται κυρίως με τις αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαλβινικές και αντικαρκινικές του δράσεις. Έτσι στην Ευρώπη, τα φύλλα λειτουργούν ως αντιβηχικά και εφιδρωτικά, ενώ τα άνθη ως αντισπασμωδικά και εμμηναγωγά. Στην Αγγλία, το ποτό των πετάλων βοήθησε στην θεραπεία της ιλαράς, της ευλογιάς, του ίκτερου, της δυσκοιλιότητας και την μείωση της ροής της εμμήνου ρήσης. Παράλληλα, στην Ινδία, τα άνθη χρησιμοποιούνται σε κρέμες για την αντιμετώπιση των πληγών του δέρματος, του έρπητα, των δερματικών βλαβών και για τον καθαρισμό του αίματος των πληγών. Χρησιμοποιείται για τη συστολή των αγγείων και για να διακοπεί αμέσως η αιμορραγία. Επίσης, η καλέντουλα έχει συνεισφέρει στην αντιμετώπιση της θεραπείας του έλκους του πεπτικού σωλήνα και στα προβλήματα των εσωτερικών οργάνων. Στην ομοιοπαθητική ιατρική το φυτό της καλέντουλας έχει συμβάλει ιδιαίτερα στην αντιμετώπιση της εξασθενημένης όρασης, των ανωμαλιών της εμμήνου ρήσεως και των αιμορροΐδων. Περαιτέρω, αποτελεί κύριο συστατικό του ομοιοπαθητικού φαρμάκου Traumeel, το οποίο βοηθάει στην ανακούφιση του πόνου από μυοσκελετικούς τραυματισμούς (Moghaddasi and Kashani, 2012).

1.6.5 Πτητικό έλαιο

Η καλέντουλα αποτελεί ένα ευρέως γνωστό φυτό, το οποίο εκτός από καλλωπιστικό χρησιμοποιείται εξίσου και στην φαρμακευτική. Το φυτό διαθέτει μέγιστο πτητικό έλαιο κατά το στάδιο της πλήρους άνθησης (0.97 %) και το ελάχιστο κατά το στάδιο που προηγείται της άνθησης (0.13 %) (AshwlayanVD and Verma, 2018).

Έπειτα από έρευνα στα αιθέρια έλαια από φύλλα και άνθη καλέντουλας προέκυψε ότι εντοπίζονται 30 κοινές ενώσεις, με την α-καδινόλη, η οποία ανήκει στα σεσκιτερπενοειδή, να είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (φύλλο: 32,3 % και άνθος: 31,3 %, αντίστοιχα). Η χημική σύνθεση των αιθέριων ελαίων μπορεί να διαφέρει από φυτό σε φυτό ακόμα και στο ίδιο είδος. Αυτές οι διαφορές στη χημική σύνθεση των φυτών οφείλονται στην αλληλεπίδρασή τους με βιοτικούς αλλά και με αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, στη μετασυλλεκτική επεξεργασία καθώς και στην συντήρηση των φυτών.

Σε άλλη έρευνα, βρέθηκαν στο αιθέριο έλαιο των λουλουδιών 47 ενώσεις που αποτελούν το 94,6 % των συνολικών ενώσεων, ενώ στο αιθέριο έλαιο των φύλλων βρέθηκαν 36 ενώσεις που αποτελούν το 93,7 % των συνολικών ενώσεων. Σημαντικά συστατικά του αιθέριου ελαίου των λουλουδιών είναι η τ-μουουρολόλη (9,1 %), το γ-ιμαχαλένιο (4,2 %), το τρικοζάνιο (4,1 %) και το α-πινένιο (3,8 %). Μερικά από τα σημαντικά συστατικά του ελαίου των φύλλων είναι το δ-καδινένιο (11,8 %), η τ-μουουρολόλη (8,5 %), το γ-ιμαχαλένιο (5,3 %), η τ-καδινόλη (4,5 %) και η φυτόλη (4,5 %). Η α-καδινόλη αποτελεί το κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα αιθέρια έλαια διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, μέσω μηχανισμών δέσμευσης και μείωσης των ελεύθερων ριζών, ενώ παράλληλα λειτουργούν και ως αναστολείς βασικών ενζύμων που βοηθούν σε διάφορες ασθένειες. Τα αντιοξειδωτικά στοιχεία μπορούν να σταματήσουν την εξάπλωση των ελεύθερων ριζών και να παρεμποδίσουν τη δημιουργία τους, συνεισφέροντας στην καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και προσφέροντας ευεργετικές ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία.

Το έλαιο της καλέντουλας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές στην ιατρική όπως στην αντιμετώπιση εκζεμάτων, τσιμπημάτων μελισσών, φλεγμονή ματιών και ως γαργάρες για πληγές στο στόμα. Ταυτόχρονα, μπορεί να ληφθεί εσωτερικά σαν σιρόπι συνεισφέροντας στην θεραπεία του πυρετού και την προώθηση της εμμήνου ρήσης. Το αιθέριο έλαιο των λουλουδιών της καλέντουλας προσφέρει εξαιρετικές θεραπευτικές δράσεις, λόγω της έντονης αντιμυκητιακής δραστηριότητας του σύμφωνα με την έρευνα του Gazim *et al.*

(2008), ενώ ιδιαίτερα σημαντική είναι η εφαρμογή του ελαίου στο δέρμα για την προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία UV-B.

1.7 Γενετική Μηχανική

Η Γενετική Μηχανική αφορά ένα σύνολο τεχνολογιών που συνεισφέρουν στην απομόνωση συγκεκριμένων γονιδίων και την ενσωμάτωσή τους στον ίδιο ή διαφορετικό οργανισμό, με σκοπό την ανάπτυξη οργανισμών με νέες επιθυμητές ιδιότητες. Το γονίδιο που μεταφέρεται ονομάζεται διαγονίδιο και μετά την εισαγωγή του στο φυτό δέκτη, αυτό θεωρείται γενετικά τροποποιημένο ή διαγονιδιακό. Ο μετασχηματισμός του φυτού αποτελεί μια διαδικασία γενετικής τροποποίησης, μέσω της εισαγωγής ξένου DNA, με σκοπό τη δημιουργία φυτών με επιθυμητές ιδιότητες. Οι τεχνικές εισαγωγής DNA μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: i) την άμεση μεταφορά και ii) την έμμεση μεταφορά γονιδίων.

Όσον αφορά την άμεση μεταφορά γονιδίων, αυτή πραγματοποιείται με τις τεχνικές της μικροέγχυσης, την ηλεκτροδιάτρηση και με την βιολιστική μέθοδο. Πιο συγκεκριμένα, κατά την μικροέγχυση, το DNA εισέρχεται απευθείας στον πυρήνα των κυττάρων μέσω λεπτών γυάλινων βελόνων. Στην ηλεκτροδιάτρηση, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ένα διάλυμα που περιέχει DNA και υποβάλλονται σε σύντομο ηλεκτρικό παλμό που επάγει προσωρινό άνοιγμα οπών στην εξωτερική μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο, το γενετικό υλικό εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και έπειτα, αν πρόκειται για ευκαρυωτικά κύτταρα, ένα μέρος του εισέρχεται στον πυρήνα (Μαθθιόπουλος, 2016). Κατά τη βιολιστική μέθοδο, το DNA επικαλύπτεται σε μικροσωματίδια, τα οποία είναι φορείς ενός χημικά αδρανούς μετάλλου (χρυσός, βολφράμιο, πλατίνα). Στη συνέχεια, γίνεται επιτάχυνση των επικαλυμμένων με DNA σωματιδίων σε υψηλές ταχύτητες (1000 m/s) προκειμένου να διαπεραστούν οι εξωτερικές κυτταρικές στοιβάδες ή τα κυτταρικά τοιχώματα και να εισέλθει το DNA στο κύτταρο. Μερικά από αυτά μεταφέρονται στα κύτταρα του δέκτη και εισέρχονται στον πυρήνα, όπου μπορούν να ενσωματωθούν στα χρωμοσώματα. Ωστόσο, το μειονέκτημα της βιολιστικής μεθόδου είναι ο περιορισμός του μεγέθους του εισαγόμενου γενετικού υλικού (Babich *et al.*, 2020).

Η μεταφορά γονιδίων στο γενετικό υλικό του φυτού έμμεσα επιτυγχάνεται μέσω φορέων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται φορείς φυτικών ιών, οι οποίοι προσφέρουν μεγάλη αποδοτικότητα και υψηλή έκφραση του γονιδίου, ενώ μεγαλύτερη και συνηθέστερη εφαρμογή παρουσιάζουν τα είδη του γένους *Agrobacterium*.

Η εισαγωγή γενετικού υλικού στα φυτά μέσω ειδών του γένους *Agrobacterium*, είναι η πιο συνηθισμένη τεχνική, καθώς είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και αποδοτική σε ένα μεγάλο εύρος φυτικών ειδών. Τα γένη του *Agrobacterium* είναι αρνητικά κατά Gram παθογόνα βακτήρια που ζουν μέσα στο περιβάλλον του εδάφους. Υπάρχουν δύο είδη του γένους *Agrobacterium* που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά γονιδίων, τα *Agrobacterium tumefaciens* και *Agrobacterium rhizogenes*, τα οποία προκαλούν την ασθένεια του 'κορωνοτού κάλλου' και την ασθένεια των 'τριχωτών ριζών', αντίστοιχα. Το *A. tumefaciens* περιέχει το πλασμίδιο Ti, που προκαλεί όγκους στις ρίζες, ενώ το *A. rhizogenes* περιέχει το πλασμίδιο Ri, που προκαλεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τυχαίων ριζών. Η γενετική πληροφορία της ασθένειας του 'κορωνοτού κάλλου', η οποία προκαλεί την ανάπτυξη του όγκου, είναι κωδικοποιημένη στο πλασμίδιο Ti, ενώ η γενετική πληροφορία ασθένειας των 'τριχωτών ριζών' κωδικοποιείται από το πλασμίδιο Ri. Τα δύο είδη των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στο γενετικό μετασχηματισμό των φυτών είναι βακτήρια στα οποία η γενετική πληροφορία των ασθενειών έχει αφαιρεθεί, και την θέση της έχει πάρει το γενετικό υλικό που σχετίζεται με την σύνθεση των οπινών, των δευτερογενών μεταβολιτών. Με την χρήση αυτής της μεθόδου έχουν μετασχηματιστεί πολλά κύρια καλλιεργούμενα φυτικά είδη, ρύζι, καλαμπόκι, καπνός και κριθάρι (Çelik, 2018).

Η μέθοδος αυτή προσφέρει τη δυνατότητα μεταφοράς ενός ή λίγων τμημάτων DNA με τα επιθυμητά γονίδια αλλά και την μεταφορά μεγάλων τμημάτων με ελάχιστη αναδιάταξη σε υψηλότερες αποδόσεις και χαμηλότερο κόστος. Ταυτόχρονα, παρατηρείται σταθερότερη ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του φυτού. Ακόμη, στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, έπειτα από την εφαρμογή αποτελεσματικών πρωτοκόλλων μετασχηματισμού, παρατηρήθηκε αυξημένη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (Dillen *et al.*, 2017).

Η καλλιέργεια και η συλλογή αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών αντιμετωπίζει σοβαρές προκλήσεις όπως έχει προαναφερθεί. Η γενετική μηχανική μπορεί να συνεισφέρει στην αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, βελτιώνοντας την ανθεκτικότητα τους στις ασθένειες, στα έντομα και στα ζιζανιοκτόνα, αυξάνοντας την απόδοση τους και την περιεκτικότητα τους σε σημαντικές βιοδραστικές ουσίες. Έτσι, η βιοτεχνολογία μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην προστασία και στην καλλιέργεια μεγάλων εκτάσεων φαρμακευτικών φυτών. Κατά την ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής των φαρμακευτικών φυτών, θα πρέπει επίσης να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ασφάλεια των διαγονιδιακών φαρμακευτικών φυτών. Αυτό θα επιτευχθεί μέσω ενός συνόλου προτύπων επιστημονικής αξιολόγησης ασφάλειας και

κρίσης που είναι κατάλληλα για διαγονιδιακά φαρμακευτικά φυτά με βάση την αναγνώριση της ιδιαιτερότητάς τους (Teng and Shen, 2015).

Η γενετική τροποποίηση στην γεωργία παρέχει σημαντικά οφέλη στην κοινωνική, οικονομική και περιβαλλοντική ευημερία. Όμως, οι οικολογικοί κίνδυνοι είναι αναπόφευκτοι ακόμα και υπό στενή παρακολούθηση. Οι πιο σοβαροί κίνδυνοι που προκύπτουν από τον γενετικό μετασχηματισμό είναι η αύξηση της γενετικής διάβρωσης και η μείωση της ποικιλομορφίας των φυτών. Η εισαγωγή ενός γονιδίου σε ένα ήδη υπάρχον γονιδίωμα μπορεί να θεωρηθεί ότι αυξάνει την βιοποικιλότητα. Ωστόσο, λόγω του ανταγωνισμού που εκδηλώνεται μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και των γενετικά τροποποιημένων φυτών, αυξάνεται ο κίνδυνος εξαφάνισης των αρχικών φυτών κατά την φυσική επιλογή και συνεπώς μειώνεται η βιοποικιλότητα. Παράλληλα, μπορεί να αυξηθεί η ανθεκτικότητα σε έντομα, να δημιουργηθούν νέα φυτοπαθογόνα και να προκληθεί καταστροφή των φυσικών σχέσεων των οργανισμών μέσα στο οικοσύστημα.

Ένα επιπρόσθετο πρόβλημα που προκύπτει κατά τη χρήση της γενετικής μηχανικής αφορά στην επιφυλακτικότητα του καταναλωτικού κοινού σχετικά με τη χρήση των νέων τεχνολογιών. Τα κοινωνικά ζητήματα που τίθενται αφορούν στην αποδοχή των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων καθώς στις ενδεχόμενες επιπτώσεις της κατανάλωσής τους στην υγεία των ανθρώπων. Οι έρευνες που επιβεβαιώνουν την ασφάλεια αυτών των προϊόντων δεν είναι επαρκείς. Ταυτόχρονα, υπάρχει ανησυχία από την μεριά των καλλιεργητών σχετικά με την κυριαρχία της αγοράς και την εξάρτηση τους από πατενταρισμένο γενετικό υλικό. Τέλος, η γενετική μηχανική στη γεωργία σχηματίζει ηθικούς προβληματισμούς και ερωτήματα αναφορικά με την ιδιοκτησία και τον έλεγχο των γενετικών πόρων (Shakya *et al.*, 2023).

1.8 Το *Agrobacterium rhizogenes*

Στο γένος *Agrobacterium* ανήκουν αρνητικά κατά Gram βακτήρια, που απαντώνται στο έδαφος και χαρακτηρίζονται από ικανότητα μόλυνσης πολλών φυτικών ειδών, που ανήκουν κυρίως στα δικοτυλήδονα αλλά και σε ορισμένα μονοκοτυλήδονα. Τα σημαντικότερα είδη του γένους είναι τα *Agrobacterium tumefaciens* και *Agrobacterium rhizogenes*, τα οποία προκαλούν την ασθένεια του 'κορωνοτού κάλλου' και την ασθένεια των 'τριχωτών ριζών' αντίστοιχα, εξαιτίας των πλασμιδίων που κατέχουν.

Το *Agrobacterium rhizogenes* είναι το παθογόνο βακτήριο υπεύθυνο για την ασθένεια των τριχωτών ριζών. Στα φυτάρια, που εκδηλώνουν την ασθένεια των τριχωτών ριζών (hairy root), παρατηρείται ανάπτυξη τριχωτών ριζών με αυξημένο ρυθμό διακλάδωσης, αυξημένη βιομάζα και, ορισμένες φορές, πλαγιοτροπική ανάπτυξη. Επίσης, συχνά απαντάται το φαινόμενο της απώλειας του γεωτροπισμού των ριζών, η απώλεια της κυριαρχίας στην κορυφή των βλαστών καθώς και ο νανισμός των φυτών (Ying *et al.*, 2023).

Η μόλυνση αρχίζει στο σημείο τραυματισμού του ξενιστή με την ένθεση και έκφραση του T-DNA του *A. rhizogenes*, μέσω του Ri πλασμιδίου (Εικόνα 1.2), στα φυτικά κύτταρα. Όταν το φυτάριο τραυματίζεται, το *Agrobacterium* μολύνει στο σημείο τραυματισμού και εισέρχεται στο φυτικό κύτταρο, ενσωματώνοντας το T-DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή. Τα γονίδια που κωδικοποιούνται εντός του T-DNA βοηθούν στην ανάπτυξη των φυτικών κυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται και συμβάλλουν στον σχηματισμό πολυάριθμων και διακλαδιζόμενων ριζών, το φαινόμενο των τριχωτών ριζών, στο σημείο της μόλυνσης στα περισσότερα δικοτυλήδονα φυτά. Παράλληλα, ένα χαρακτηριστικό της διαδικασίας αποτελεί η ικανότητα ταχείας ανάπτυξης των ριζών, χωρίς την παρουσία ρυθμιστών αύξησης (Veena and Taylor, 2007).

Μετά την επιτυχή ένθεση των γονιδίων T-DNA (10-30 kbp) στο πυρηνικό DNA, το φυτό-ξενιστής υπόκειται σε μεταβολές που επάγονται από το ξένο DNA, με κύριο σύμπτωμα τον ανεξέλεγκτο σχηματισμό των ριζών στο σημείο της μόλυνσης (Faraz *et al.*, 2020). Το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε αρχικά από τους Riker *et al.*, (1930) ως μολυσματικές ή τριχωτές ρίζες. Το T-DNA κωδικοποιεί γονίδια σύνθεσης για ασυνήθιστα αμινοξέα ή σακχαροφωσφοδιεστέρες, που γενικά ονομάζονται οπίνες. Το σύστημα μεταφοράς T-DNA υπήρξε η θεμελιώδης βάση για τη δημιουργία φυτικών φορέων και διαγονιδιακών φυτών (Moriguchi *et al.*, 2001).



Εικόνα 1.2 Μορφολογία του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes* (Πηγή: <https://www.sandi.org/animal-of-the-week/rhizobium-rhizogenes/>).

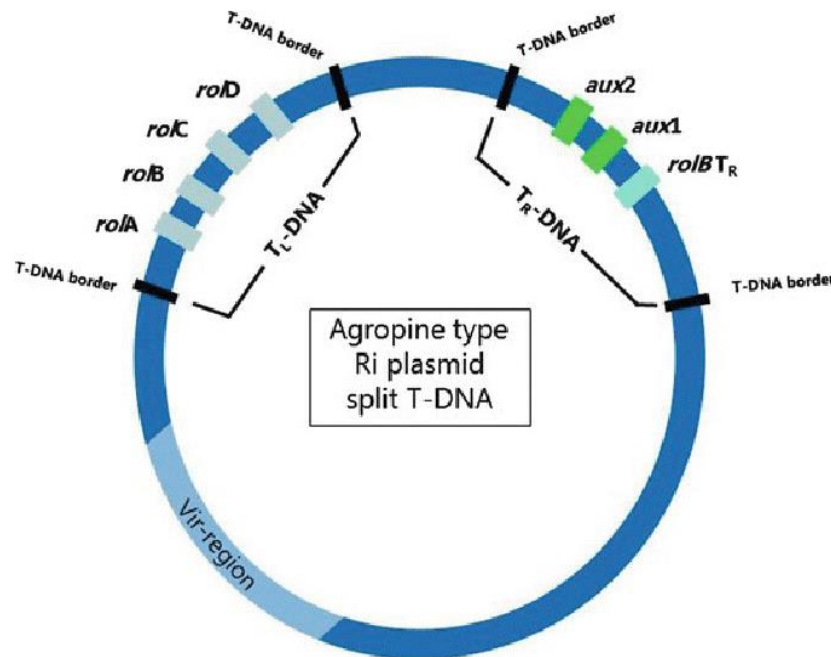
1.8.1 Το Πλασμίδιο Ri

Το *Agrobacterium rhizogenes* διαθέτει μια εξωχρωμοσωμική κυκλική δομή DNA, γνωστή ως πλασμίδιο Ri (Εικόνα 1.3). Το πλασμίδιο είναι υπεύθυνο για την μολυσματικότητα του βακτηρίου και διαθέτει σχετικά μεγάλο μέγεθος που κυμαίνεται από 180 έως 250 kpb. Τα στελέχη του *A. rhizogenes* κατηγοριοποιούνται με βάση τις οπίνες που σχηματίζονται από τους μετασχηματισμένους ιστούς των πλασμιδίων. Αυτά τα στελέχη διαχωρίζονται σε τέσσερις ομάδες με βάση τις οπίνες: την μαννοπίνη, την αγραπίνη, την μικιμοπίνη και κουκουμοπίνη (Desmet et al., 2020).

Τα μη-μεταφερόμενα μέρη του πλασμιδίου στο γονιδίωμα του φυτού-ξενιστή είναι η περιοχή της μολυσματικότητας, η αρχή της αντιγραφής και η περιοχή καταβολισμού των οπινών. Το μεταφερόμενο τμήμα του πλασμιδίου Ri είναι το T-DNA. Το τμήμα αυτό του DNA διαθέτει γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για την σύνθεση των οπινών, για την επαγωγή τριχωτών ριζών, όπως τα γονίδια *rol*, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *rolA*, *rolB*, *rolC* και *rolD* και άλλων γονιδίων άγνωστης λειτουργίας (ORFs).

Το T-DNA των στελεχών τύπου agropine διαχωρίζεται σε δύο μέρη το TL - DNA και το TR – DNA, τα οποία διαχωρίζονται με 15 kb μη-μεταφερόμενου DNA. Στην περίπτωση των στελεχών τύπου agropine, το TL-DNA και το TR-DNA μεταφέρονται και εισέρχονται ξεχωριστά στο γονιδίωμα του φυτού ξενιστή, όμως μόνο το TL-DNA προκαλεί την ανάπτυξη των τριχωτών ριζών. Το TL-DNA του στελέχους της αγραπίνης φέρει ομοιότητες με τα

στελέχη της μαννοπίνης, της κουκουμοπίνης και της μικιμοπίνης, τα οποία αποτελούνται αποκλειστικά μόνο από ένα T-DNA.



Εικόνα 1.3 Πλασμίδιο Ri (στέλεχος αγροπίνης) του *A. rhizogenes* (Πηγή Lütken *et al.*, 2017)

1.8.2 Εφαρμογές του μετασχηματισμού μέσω του *A. rhizogenes* σε αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά

Ο σχηματισμός διαγονιδιακών φυτών, με τη χρήση του *Agrobacterium rhizogenes*, επιδιώκεται τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερο εξαιτίας των «σύνθετων» φυτών που προκύπτουν σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (3-4 εβδομάδες) και της ευκολίας εφαρμογής των πρωτοκόλλων μετασχηματισμού. Αποτελεί μια μέθοδο υψηλής αποτελεσματικότητας και χαμηλού κόστους με δυνατότητα ενδεδειγμένης μελέτης του γενετικά τροποποιημένου ριζικού συστήματος. Συνεπώς, η διαμεσολάβηση του *A. rhizogenes* βοήθησε ιδιαίτερα στην απόκτηση φαινοτυπικά διακριτών φυτών με σημαντικά γνωρίσματα σε πολλά φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.

Στα φαρμακευτικά φυτά, η χρήση του *A. rhizogenes*, για την ανάπτυξη σύνθετων φυταρίων, με μετασχηματισμένο ριζικό σύστημα και με υπέργεια μέρη αγρίου τύπου, στοχεύει στην σύνθεση και την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών. Οι μετασχηματισμένες ρίζες έχουν την ικανότητα να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες και βιοδραστικά συστατικά, όπως και οι ρίζες των μη διαγονιδιακών φυτών, ενώ σε πολλές περιπτώσεις, η ποσότητα αυτών στις ανασυνδυασμένες ρίζες είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν που παράγουν οι ρίζες αγρίου

τύπου. Αυτό οφείλεται στην γενετική σταθερότητα του ριζικού συστήματος των σειρών-Ri καθώς και στην ικανότητα αυτόνομης ανάπτυξης, απουσία φυτοορμονών και ρυθμιστών ανάπτυξης (Fazar *et al.*, 2020).

Εδώ και πολλές δεκαετίες, το *Agrobacterium rhizogenes* έχει χρησιμοποιηθεί για το γενετικό μετασχηματισμό των φαρμακευτικών φυτών με στόχο την παραγωγή και την ενίσχυση των δευτερογενών μεταβολιτών. Από τότε, ο μετασχηματισμός μέσω της αξιοποίησης του βακτηρίου, έχει χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας *Asteraceae* με στόχο την αύξηση των βιοδραστικών ουσιών που εμπεριέχονται στα νέα «σύνθετα» φυτά. Μεταξύ των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που έχουν μετασχηματιστεί γενετικά με τη χρήση του βακτηρίου *A. rhizogenes* συγκαταλέγονται τα είδη που ανήκουν στα γένη *Arnica*, *Inula*, *Calendula*, *Tragopogon*, *Tussilago*, *Artemisia*, *Sylibium*, *Stevia*, *Echinacea*. Ενδεικτικά, ο μετασχηματισμός των φυτών της Αρτεμισίας (*Artemisia annua*), μέσω του βακτηριακού στελέχους LBA 9402, οδήγησε σε υψηλότερη συσσώρευση αρτεμισινίνης στις διαγονιδιακές ρίζες των σύνθετων φυτών συγκριτικά με τις ρίζες των φυτών αγρίου τύπου (Matvieieva, 2015).

Η καλέντουλα (*Calendula officinalis*) αποτελεί ένα φαρμακευτικό φυτό, στο οποίο έχουν εφαρμοστεί πρωτοκόλλα που στοχεύουν στην ανάπτυξη διαγονιδιακού ριζικού συστήματος με στόχο την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει διάφορες μελέτες, με στόχο τον μετασχηματισμό της καλέντουλας. Μία από τις πρόσφατες μελέτες, αποσκοπούσε στην υψηλή παραγωγή σαλικυλικού οξέος, χημική ουσία που βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες στα φυτά και βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στα καλλυντικά. Η έρευνα περιλάμβανε τη χρήση του βακτηριακού στελέχους ATC 133332 του *A. rhizogenes* για το μετασχηματισμό φύλλων καλέντουλας με εμβολιασμό και συγκαλλιέργεια και οδήγησε σε ανάπτυξη μετασχηματισμένων ριζών και κάλου, καθώς και στην αυξημένη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος σε σχέση με τα μη διαγονιδιακά φυτά (Kassab, 2022).

Στη συνέχεια, οι Dlugosz *et al.* (2013) εστίασαν στην ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών καλέντουλας με τη χρήση του βακτηριακού στελέχους ATCC 15834 του *A. rhizogenes* για το μετασχηματισμό των κοτυληδόνων και των υποκοτυλίων με εμβολιασμό. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εντονότερη επαγωγή τριχωτών ριζών για τις κοτυληδόνες σε σχέση με τα υποκοτύλια και την αυξημένη σύνθεση του ολεανολικού οξέους στις ανασυνδυασμένες ρίζες σε σχέση με τις ρίζες αγρίου τύπου.

Σκοπός της Μελέτης

Στο πλαίσιο αναζήτησης μεθόδων για ενίσχυση της παραγωγής βιοδραστικών ενώσεων, ο γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση του βακτηριακού φορέα *A. rhizogenes*, αποτελεί προσέγγιση που έχει αποδείξει την αποτελεσματικότητά της σε πληθώρα σημαντικών φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Αντικείμενο της πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού στο είδος *Calendula officinalis* L. που έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων του. Απώτερο σκοπό αποτελεί η ευχερής παραγωγή διαγονιδιακών ριζών που χαρακτηρίζονται από αυξημένη βιομάζα κατάλληλης ποιότητας για αξιοποίηση των βιοδραστικών συστατικών που παράγονται στις ρίζες του φυτού.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Γενετικό υλικό

Για την εκτέλεση των πειραμάτων γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν σπόροι του είδους *Calendula officinalis*, με κοινό όνομα καλέντουλα, καλέντουλα η φαρμακευτική ή νεκρολουλούδο. Με σκοπό να εξασφαλιστεί η ταυτότητα και η καθαρότητα του γενετικού υλικού, η προμήθεια των σπόρων έγινε από την εταιρία Graines Volts (<https://www.graines-voltz.com/>), εταιρία παραγωγής και διανομής σπόρων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.

Το συγκεκριμένο φυτικό είδος είναι ετήσιο αρωματικό φυτό με βάρος 1000 σπόρων 5 γραμμάρια, ενώ ο σπόρος έχει ελλειπτικό - σελινοειδές σχήμα και χρώμα υπόλευκο - υποκίτρινο. (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Σπόροι του φυτού *Calendula officinalis*.

2.2 Στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* - Συνθήκες ανάπτυξης

Για το μετασχηματισμό των φυτών καλέντουλας, έγινε χρήση των βακτηριακών στελεχών του *Agrobacterium rhizogenes* R1000 και A4. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε 10 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB (Luria-Bertani (LB) broth) που περιείχε τα κατάλληλα αντιβιοτικά *epilog;hw*, για διάστημα 2 ημερών, στους 28 °C ή έως ότου αποκτήσουν $OD_{600} = 0,6-1,0$. Ειδικότερα, στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε το αντιβιοτικό ναλιδιξικό οξύ (25 $\mu\text{g/ml}$), για το στέλεχος R1000 και το αντιβιοτικό σπεκτινομυκίνη (50 $\mu\text{g/ml}$), για το στέλεχος A4.

Με σκοπό τη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων, 10 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 10 ml MS και εκ νέου φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος (pellet) σε 1 ml υγρό MS, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο για τον εμβολιασμό των φυτών καλέντουλας.

2.3 Μετασχηματισμός σποροφύτων καλέντουλας μέσω του *A. rhizogenes*

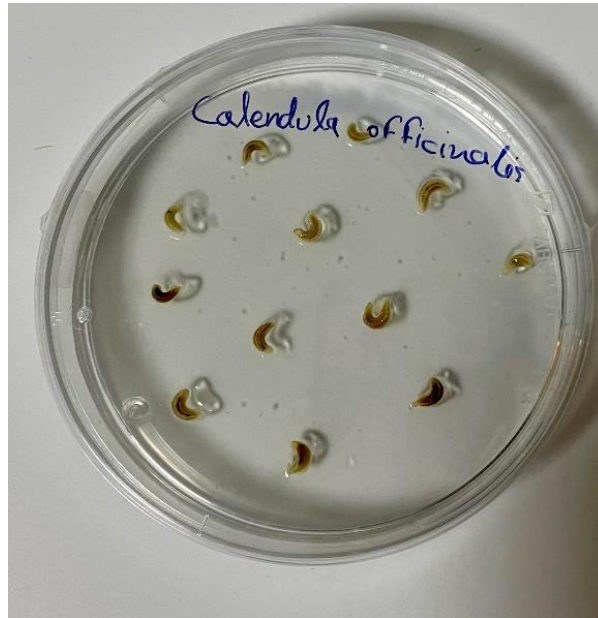
Για την εκτέλεση του γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν υγιή σπορόφυτα καλέντουλας, ηλικίας 1 εβδομάδας, με φυσιολογικό φαινότυπο. Η διαδικασία εμβολιασμού των σποροφύτων βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Pavli και Skaracis (2010).

Πίνακας 2.1 Σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή της ανάπτυξης διαγονιδιακών ριζών, μέσω του βακτηρίου *A. rhizogenes*, στο είδος *Calendula officinalis*.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΣΥΝΘΕΣΗ	
Υπόστρωμα βλάστησης σπορόφυτων	MS/vitamins	1.075 gr
	Sucrose	10 gr
	Agar	2.5 gr
Υπόστρωμα συν-καλλιέργειας	MS/MES/vitamins	1.225 gr
	Sucrose	10gr
	Agar	4 gr
	Acetosyrigone	100 mg/ml
Υπόστρωμα ριζοβολίας	MS/MES/vit	1.225 gr
	Sucrose	15gr
	Agar	4 gr
	Cefotaxime	125 mg/ml
MS	MS/MES/vitamins	2.45 gr
	Sucrose	15gr
	Acetosyrigone	100 mg/ml

Αρχικά, έγινε απολύμανση των σπόρων με διάλυμα χλωρίνης 20 % σε falcon των 50 ml χλωρίνης για 5 λεπτά. Εν συνεχεία, ακολούθησαν 3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών με

αποστειρωμένο dH₂O και έπειτα, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Απολυμασμένοι σπόροι καλέντουλας προς βλάστηση σε τριβλία που περιέχουν υπόστρωμα βλάστησης.

Τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm και μεταφέρθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες στους 22 °C, 16 ώρες φωτός / 8 ώρες σκοτάδι, για διάστημα 1 εβδομάδας προκειμένου τα σπορόφυτα να φτάσουν σε κατάλληλο στάδιο για το μετασχηματισμό. Μετά το πέρας της 1 εβδομάδας, χρησιμοποιήθηκαν υγιή σπορόφυτα για το μετασχηματισμό.

Για την προετοιμασία των εκφύτων, οι υπάρχουσες ρίζες αποκόπηκαν στην περιοχή του υποκοτυλίου, με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, και στη συνέχεια ακολούθησε η εμφύτευση του τραυματισμένου άκρου εντός της καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων (Εικόνα 2.3).

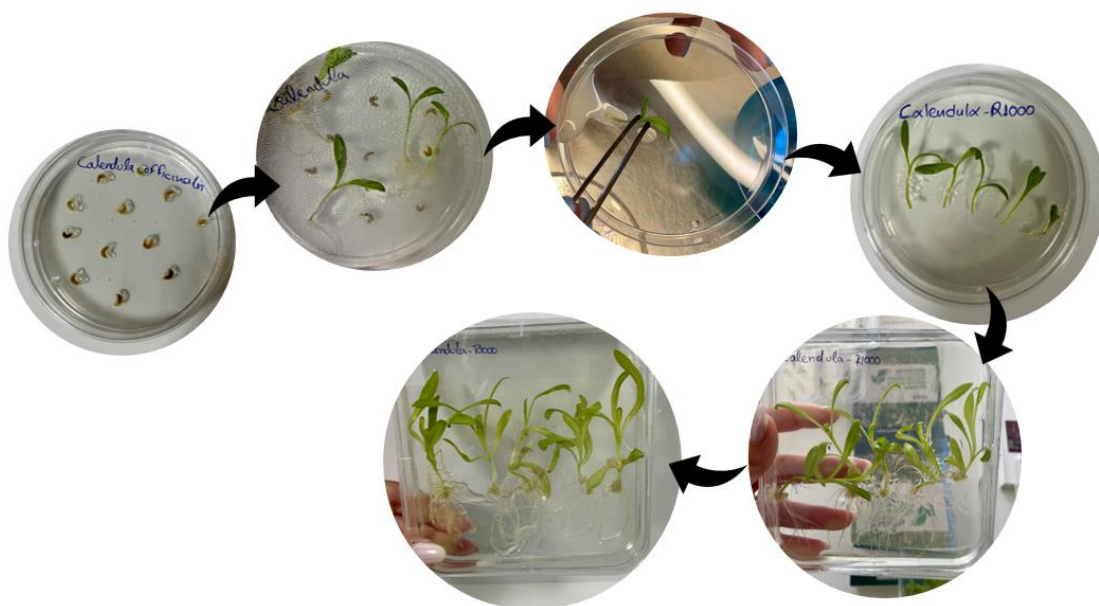


Εικόνα 2.3 Εμβάπτιση εκφύτων καλέντουλας στα βακτηριακά κύτταρα.

Έπειτα, τα εμβολιασμένα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τριβλία Petri που περιείχαν υπόστρωμα συν-καλλιέργειας. Τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm και ακολούθησε επώαση για 3 ημέρες σε ελεγχόμενες συνθήκες (23 °C με 16 ώρες φωτός / 8 ώρες σκοτάδι). Στη συνέχεια, με σκοπό την αναχαίτιση της ανάπτυξης των βακτηρίων, τα μετασχηματισμένα φυτά καλέντουλας μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τριβλία Petri που περιείχαν υπόστρωμα επαγωγής ριζών – υπόστρωμα ριζοβολίας εμπλουτισμένου με το αντιβιοτικό σεφοταξίμη (125 mg/ml).

Μετά από 15 ημέρες, τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών που περιέχει σεφοταξίμη. Τα τριβλία Petri σφραγίστηκαν μερικώς και τοποθετήθηκαν υπό κλίση σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών για διάστημα 15 ημερών (Εικόνα 2.4).

Η αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού αξιολογήθηκε με βάσει το φαινότυπο των ριζικών τριχιδίων που σχηματίστηκαν στο σημείο εμβολιασμού.



Εικόνα 2.4 Διαδικασία επαγωγής τριχωτών ριζών στο είδος *Calendula officinalis*.

2.4 Συλλογή ιστού και Εξαγωγή DNA

Με στόχο την επιβεβαίωση της επιτυχίας του μετασχηματισμού, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τις ρίζες των μετασχηματισμένων φυτών και των φυτών αγρίου τύπου (μάρτυρες) και ακολούθησαν αντιδράσεις PCR ώστε να διερευνηθεί η επιτυχής ένθεση του διαγονιδίου *rolB2*.

Για τη δειγματοληψία, έγινε αποκοπή με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού των προϋπαρχουσών ριζών από τα μετασχηματισμένα και τα αγρίου τύπου φυτά καλέντουλας και τα δείγματα, αφού σημάνθηκαν με κωδικό αριθμό, τοποθετήθηκαν απευθείας σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), με στόχο την αποφυγή αλλοιώσεων, έως ότου γίνει η απομόνωση DNA.

Η απομόνωση DNA έγινε με τη χρήση του Kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co). Τα δείγματα των ριζών λειοτριβήθηκαν σε κατάλληλα γουδιά με προσθήκη υγρού αζώτου, έως σημείου κονιορτοποίησης, ενώ έπειτα 100 mg ιστού ανά δείγμα τοποθετήθηκε σε eppendorf. Έπειτα, προστέθηκαν 400 μl διαλύματος PL1, με στόχο τη λύση των κυττάρων και έπειτα από ανακίνηση προστέθηκαν 10 μL RNase A. Μετά, έγινε η επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 10 λεπτά. Ακολούθησε μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf με στήλη NucleoSpin® Plant II, και έπειτα φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 2

λεπτά. Αργότερα, προστέθηκαν 450 µl buffer PC και τα δείγματα μεταφέρθηκαν στη στήλη NucleoSpin® Plant II, η οποία έχει την ιδιότητα συγκράτησης του DNA. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό και προσθήκη 400 µl διαλύματος έκπλυσης (PW1) και ξανά φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό.

Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 700 µl διαλύματος έκπλυσης (PW2), ακολούθησε η φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό και απομακρύνθηκε το υποκείμενο. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλήφθηκε ακόμα 1 φορά με 200 ml διαλύματος, φυγοκέντρωση και απομάκρυνση του υποκειμένου. Η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα νέο Eppendorf και προστέθηκαν 50 µl διαλύματος έκλουσης (PE) και μετά από 5 λεπτά επώασης των δειγμάτων στους 65 °C σε υδατόλουτρο, πραγματοποιήθηκε η φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό.

Έπειτα, η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα νέο σωλήνα Eppendorf και έγινε έκλυση του DNA με την προσθήκη 50 µl ddH₂O. Έγινε επώαση του δείγματος για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Ολοκληρώνοντας, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20 °C.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους/ορατού με απορρόφηση στα 260 nm, ενώ η συγκέντρωση του γονιδιωµατικού DNA υπολογίστηκε σε ng/µL.

2.5 Έλεγχος του μετασχηματισμού μέσω PCR

Στο πλαίσιο αξιολόγησης του μετασχηματισμού, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με στόχο την ενίσχυση του διαγονιδίου *rolB2* και της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes*. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Τα ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των αλληλουχιών *rolB2* και *virCD*.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
<i>rolB2</i> -F	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT	52	423	Thilip et al., 2015
<i>rolB2</i> -R	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	52		
<i>virCD</i> -F	CTCATCAGGCACGCTTG	52	1074	Pavli and Scarakis 2010
<i>virCD</i> -R	GCGGATGCTTCAAATGG	52		

Το μίγμα της PCR περιείχε 40 ng DN, 0.25 μM για κάθε εκκινητή, 200 μM dNTPs, 1.25 mM MgCl₂, 1x Taq buffer και 1.25 u Taq πολυμεράση (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega) και ddH₂O έως τελικού όγκου 25 μl.

Το πρόγραμμα της PCR περιελάμβανε έναν αρχικό κύκλο στους 94 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια 30 κύκλους ενίσχυσης, στους 94 °C για 1 λεπτό, 52 °C για 1 λεπτό, 72 °C για 1 λεπτό, και ένα τελικό κύκλο επιμήκυνσης στους 72 °C για 7 λεπτά.

2.5 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αгарόζης

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,5 % με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) για 2.5 ώρες στα 60 V. Για την οπτικοποίηση των PCR προϊόντων έγινε προσθήκη της χρωστικής Midori (Midori Green Advance) και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

3. Αποτελέσματα

3.1 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού στο είδος *Calendula officinalis*

Η παρούσα μελέτη εστίασε στη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της καλέντουλας που επιτρέπει την ταχεία ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών. Απώτερο στόχο αποτελεί η τροποποίηση του ριζικού συστήματος, με τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται αύξηση της βιομάζας των ριζών και δυνητική αύξηση της παραγόμενης ποσότητας δευτερογενών μεταβολιτών στις ρίζες. Για τη γενετική τροποποίηση της καλέντουλας χρησιμοποιήθηκε ως φορέας μετασχηματισμού το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* και συγκεκριμένα τα στελέχη *R1000* και *A4*.

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, με εμβολιασμό των σποροφύτων καλέντουλας, ηλικίας μίας εβδομάδας, στην περιοχή του υποκοτυλίου. Η αποδοτικότητα του πρωτοκόλλου βασίστηκε στην συγκριτική αξιολόγηση των εμβολιασμένων εκφύτων με τα σπορόφυτα του αγρίου τύπου.

3.1.1 Χρόνος έκπτυξης ριζών μετά τον εμβολιασμό

Μετά τον εμβολιασμό των εκφύτων καλέντουλας με το αντίστοιχο εμβόλιο, που προερχόταν από τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *A4*, ακολούθησε η καταγραφή του χρονικού διαστήματος που πέρασε για την εμφάνιση των νέων ριζών. Συγκεκριμένα, η εμφάνιση των ριζών που εμβολιαστήκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *A4*, σημειώθηκε σε διάστημα 5 ± 1 ημερών, μετά τον εμβολιασμό, χωρίς να καταγράφονται διαφορές μεταξύ των εκφύτων που εμβολιάστηκαν με τα διαφορετικά στελέχη. Τα φυτά καλέντουλας που μετασχηματίστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*, ανέπτυξαν ρίζες που χαρακτηρίζονταν από το διακριτό φαινότυπο των θυσσανωδών ριζών, ενώ τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος *A4* παρουσίασαν φαινότυπο παρόμοιο με αυτό των φυτών αγρίου τύπου.

3.1.2 Φαινότυπος των μετασχηματισμένων ριζών στο είδος *Calendula officinalis*.

Στο πλαίσιο της συγκριτικής αξιολόγησης των φυτών που μετασχηματίστηκαν με τα στελέχη *R1000* και *A4* και των φυτών αγρίου τύπου, κατά το διάστημα μετά τον εμβολιασμό των

εκφύτων λαμβάνονταν τακτικά παρατηρήσεις που αφορούσαν κατά βάση στην ανάπτυξη και μορφολογία του ριζικού συστήματος των φυτών αλλά και στο υπέργειο μέρος αυτών.

Οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών, μεγιστοποιήθηκαν περίπου στις τέσσερις εβδομάδες έπειτα από τον εμβολιασμό. Συγκεκριμένα, τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος *R1000* του *A. rhizogenes* σχημάτισαν στο σημείο του εμβολιασμού κάλλου και, εν συνεχεία, σημειώθηκε εμφάνιση νεοεκπυττούμενων ριζών. Το ριζικό σύστημα των φυτών αυτών χαρακτηρίζονταν από αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων, αυξημένη βιομάζα και ορισμένου βαθμού πλαγιοτροπική ανάπτυξη (Εικόνα 3.1).

Από την άλλη πλευρά, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *A4* του *A. rhizogenes*, σχημάτισαν ριζικό σύστημα, το οποίο εμφάνιζε μικρές διαφορές στη δομή και μορφολογία των ριζών σε σχέση με αυτό των φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 3.2). Το ριζικό σύστημα των εν λόγω φυτών εμφάνισε αυξημένη βιομάζα, συγκριτικά με το αντίστοιχο των φυτών αγρίου τύπου, χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται διακριτές διαφορές στη γενικότερη μορφολογία των ριζών των δύο κατηγοριών φυτών. Σημειώνεται ωστόσο, ότι η απουσία φαινοτυπικών διαφορών μεταξύ των μετασχηματισμένων και των φυτών αγρίου τύπου δε συνεπάγεται ανεπιτυχή μετασχηματισμό. Στις Εικόνες 3.1 και 3.2 παρουσιάζεται το μοτίβο ανάπτυξης των μετασχηματισμένων ριζών καλέντουλας με τα βακτηριακά στελέχη *R1000* και *A4* συγκριτικά με το ριζικό σύστημα των φυτών αγρίου τύπου.



Εικόνα 3.1 Συγκριτική απεικόνιση των φυτών αγρίου τύπου (αριστερά) και των φυτών που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *R1000* (δεξιά), 4 εβδομάδες μετά τον μετασχηματισμό.

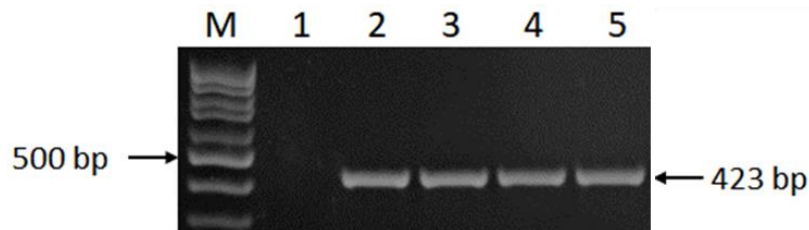


Εικόνα 3.2 Συγκριτική απεικόνιση των φυτών αγρίου τύπου (αριστερά) και των φυτών που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *A4* (δεξιά), 4 εβδομάδες μετά τον μετασχηματισμό.

3.2 Επιβεβαίωση της επιτυχίας του μετασχηματισμού

Με στόχο τον έλεγχο της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου *rolB2* στις ρίζες των μετασχηματισμένων φυτών, διενεργήθηκαν αντιδράσεις PCR με χρήση εξειδικευμένων εκκινητών. Επιπλέον, ώστε να επιβεβαιωθεί η απουσία υπολειμμάτων του βακτηρίου στις νεοεκπτυσσόμενες ρίζες, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR που στόχευαν στην ενίσχυση της αλληλουχίας *virCD* του *A. rhizogenes*.

Η παρουσία του γονιδίου *rolB2* (423 bp) επιβεβαιώθηκε στα δείγματα ριζών που σχηματίστηκαν μετά από εμβολιασμό με τα στελέχη *R1000* και *A4* (Εικόνα 3.3). Επιπλέον, διαπιστώθηκε η αδυναμία ενίσχυσης του γονιδίου *rolB2* στις ρίζες των φυτών αγρίου τύπου (Εικόνα 3.3). Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν τον επιτυχή μετασχηματισμό και τη διαγονιδιακή φύση των ριζών που αναπτύχθηκαν μετά από εμβολιασμό με τα στελέχη *R1000* και *A4* του *A. rhizogenes*.



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την ενίσχυση του διαγονιδίου *rolB2* (423 bp) που εντοπίζεται στην T-DNA του *A. rhizogenes*. M: DNA Ladder (100 bp DNA Ladder, NIPPON Genetics Europe). 1: ρίζα φυτού αγρίου τύπου. 2, 3: ρίζες που σχηματίστηκαν μετά από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*. 4, 5: ρίζες που σχηματίστηκαν μετά από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος *A4*.

Σχετικά με τις αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της παρουσίας του βακτηρίου στις ρίζες που αναπτύχθηκαν έπειτα από εμβολιασμό των φυτών με τα στελέχη *R1000* και *A4*, τα αποτελέσματα κατέδειξαν την αδυναμία ενίσχυσης της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* στο σύνολο των ριζών που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.4). Η ενίσχυση της περιοχής *virCD*, όπως αναμενόταν, κατέστη εφικτή μόνο στο δείγμα των βακτηριακών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας στις αντιδράσεις PCR (Εικόνα 3.4). Τα συνολικά ευρήματα υποδεικνύουν την απουσία τυχόν υπολειμμάτων του βακτηρίου στις ρίζες που αναπτύχθηκαν στα μετασχηματισμένα φυτά, παρέχοντας επιπλέον ενδείξεις σχετικά με την επιτυχία του μετασχηματισμού και τη διαγονιδιακή φύση των ριζών που σχηματίστηκαν στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη *R1000* και *A4*.



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την ενίσχυση της περιοχής *virCD* (1074 bp) του *A. rhizogenes*. M: DNA Ladder (100bp DNA Ladder, NIPPON Genetics Europe). 1: ρίζα φυτού αγρίου τύπου. 2: ρίζες που σχηματίστηκαν μετά από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*. 3: ρίζες που σχηματίστηκαν μετά από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος *A4*. 4: Κύτταρα του στελέχους *R1000*. 5: Κύτταρα του στελέχους *A4* του *A. rhizogenes*.

4. Συζήτηση

Κατά το πέρασμα των αιώνων οι άνθρωποι βασίστηκαν στα αγαθά που προσφέρει η φύση για την κάλυψη των βασικών αναγκών τους, όπως είναι ο ρουχισμός, η παραγωγή τροφίμων, καταφυγίου, γεύσεων και αρωμάτων καθώς και φαρμάκων. Τα φυτά αποτελούν τα θεμέλια των εξελιγμένων συστημάτων παραδοσιακής ιατρικής, τα οποία συνεχίζουν να προσφέρουν νέες θεραπείες μέχρι και σήμερα. Η αντιμετώπιση των ασθενειών με φαρμακευτικά φυτά βασίζεται σε εμπειρικά ευρήματα εκατοντάδων έως και χιλιάδων ετών, ενώ πλέον τα φυτικά προϊόντα και τα παράγωγά τους αποτελούν το 50 % των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται στο πλαίσιο άμυνας και προσαρμογής των φυτών στα περιβάλλοντα ανάπτυξής τους, αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις των φυτών που αξιοποιούνται ως κύρια συστατικά των φυτικών φαρμάκων (Gurib-Fakim, 2006).

Η φαρμακευτική σημασία των φυτών οφείλεται στην παρουσία πληθώρας χημικών ενώσεων με λειτουργικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, η καλέντουλα αποτελεί πολύτιμη πηγή σημαντικών βιοδραστικών συστατικών, όπως καροτενοειδή, φλαβονοειδή, σαπωνίνες, στερόλες, φαινολικά οξέα και λιπίδια, που αξιοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική, λόγω της αντιφλεγμονώδους, αναλγητικής και αντισηπτικής τους δράσης. Το σύνολο σχεδόν των φυτικών μερών, συμπεριλαμβανομένων των ανθέων, φύλλων και ριζών, προσφέρουν ισχυρή θεραπευτική δράση. Τα άνθη αξιοποιούνται στην παρασκευή εκχυλισμάτων, βαμμάτων και αλοιφών που εφαρμόζονται απευθείας στο δέρμα για την επούλωση των πληγών.

Με δεδομένο το βιοδραστικό δυναμικό των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, συμπεριλαμβανομένης της καλέντουλας, υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για την αξιοποίησή τους στο πλαίσιο παρασκευής φαρμάκων, καλλυντικών ή/και διατροφικών συμπληρωμάτων. Προς την κατεύθυνση αυτή, τα επιτεύγματα στους τομείς της ιστοκαλλιέργειας και της βιοτεχνολογίας προσφέρουν δυνατότητες αξιοποίησης των διαθέσιμων μεθόδων για την αύξηση της φυτικής βιομάζας που αποτελεί εργοστάσιο παραγωγής βιοδραστικών συστατικών. Στο επίπεδο αυτό, πέραν της ποσότητας της φυτικής βιομάζας, είναι εξίσου σημαντική η επαναλήψιμη παραγωγή και η ποιότητα αυτής. Βάσει των ανωτέρω, γίνεται αντιληπτή η ανάγκη ανάπτυξης καινοτόμων προσεγγίσεων για την κατά το δυνατό βέλτιστη αξιοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Οι κύριες τεχνολογίες που αξιοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι η *in*

in vitro καλλιέργεια των ιστών καθώς και οι μέθοδοι γενετικής μηχανικής που συνολικά προσφέρουν δυνατότητες διατήρησης, πολλαπλασιασμού, και αξιολόγησης της γενετικής ποικιλότητας, συνεισφέροντας στη στοχευμένη βελτίωση των φαρμακευτικών φυτών.

Μεταξύ των μεθόδων γενετικής μηχανικής, ο μετασχηματισμός μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes* αποτελεί μία προσέγγιση που έχει κεντρίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς προσφέρει δυνατότητες ταχείας και αποτελεσματικής παραγωγής διαγονιδιακών ριζών σε ένα μεγάλο εύρος φυτικών ειδών. Στο πλαίσιο αυτό, το βακτήριο *A. rhizogenes*, που συνιστά το παθογόνο αίτιο της ασθένειας των τριχωτών ριζών, έχει αξιοποιηθεί ως φορέας για το μετασχηματισμό αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών με στόχο την αύξηση της βιομάζας ριζών, συνεισφέροντας παράλληλα στην αύξηση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Niazian, 2019). Τα διαγονιδιακά φυτά που προκύπτουν εμφανίζουν αλλοιωμένο φαινότυπο της ρίζας, εξαιτίας της δράσης των γονιδίων *rol*, που αφορά κυρίως στη γρήγορη και έντονη ανάπτυξη ριζών που φέρουν άφθονες πλευρικές διακλαδώσεις και ταχεία επιμήκυνση των άκρων τους.

Τα μετασχηματισμένα φυτά ποικίλουν ως προς της μορφολογία τους, την ανάπτυξη και την ικανότητα σύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ συχνά αναφέρεται ότι οι διαγονιδιακές ρίζες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού που παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες συγκριτικά με τα μητρικά φυτά. Γενικά, αναφέρεται ότι η ποσότητα των παραγόμενων μεταβολιτών σχετίζεται κατά κύριο λόγο με την φύση του διαγονιδίου και τη θέση ένθεσης του T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού-ξενιστή. Όλοι αυτοί οι αλλοιωμένοι φαινότυποι που αποτελούν το "σύνδρομο των τριχωτών ριζών" οφείλονται στην συνδυασμένη έκφραση των γονιδίων *rolA*, *rolB* και *rolC*. Τα γονίδια *rolA* σχετίζονται με τη βράχυνση των μεσογονάτιων και το ρυτίδωμα των φύλλων. Αντιστοίχως, το γονίδιο *rolB* σχετίζονται με το μειωμένο μήκος των στημώνων, και τις τυχαίες ρίζες στους μίσχους, ενώ το γονίδιο *rolC* προκαλεί την μειωμένη επικράτηση της κορυφής, την βράχυνση των μεσογονάτιων και την αυξημένη διακλάδωση (Roychowdhury *et al.*, 2012).

Η καλέντουλα αποτελεί φαρμακευτικό φυτό που έχει μελετηθεί ως προς τη δυνατότητα επαγωγής τριχωτών ριζών με στόχο την αυξημένη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, χωρίς όμως να έχει διεξαχθεί εκτεταμένη έρευνα σχετικά με την ανάπτυξη πρωτοκόλλων μετασχηματισμού του ριζικού της συστήματος. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της καλέντουλας μέσω του *A. rhizogenes* με στόχο την ευχερή και ταχεία ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών. Απώτερο σκοπό

αποτελεί η αύξηση της βιομάζας των ριζών με στόχο τη χρήση τους σε διαδικασίες εξαγωγής δευτερογενών μεταβολιτών με βιοδραστικές ιδιότητες. Στοχεύοντας στη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, μελετήθηκαν συγκριτικά 2 βακτηριακά στελέχη του *A. rhizogenes*, τα *R1000* και *A4*.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την σημαντικότητα της επίδρασης του βακτηριακού στελέχους στην αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού. Οι διαφορές μεταξύ των βακτηριακών στελεχών αφορούσαν κυρίως στο σχηματισμό κάλλου στο σημείο εμβολιασμού καθώς και στη μορφολογία του ριζικού συστήματος, ενώ αντίθετα τα στελέχη δε διέφεραν ουσιαστικά ως προς το χρόνο ανάπτυξης των διαγονιδιακών ριζών. Σε σχέση με το φαινότυπο των μετασχηματισμένων ριζών, παρατηρήθηκαν σαφείς διαφορές, με το στέλεχος *R1000* να αναδεικνύεται ως πιο ικανό στην ανάπτυξη ριζών που εμφανίζουν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των θυσσανωδών ριζών. Ειδικότερα, το ριζικό σύστημα των φυτών που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος *R1000* εμφάνισε αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων, ανάπτυξη ριζικών τριχιδίων και αυξημένη βιομάζα ριζών συγκριτικά τόσο με τους μάρτυρες όσο και με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *A4*. Επίσης, είναι χαρακτηριστικό ότι τα φυτά αυτά σχημάτισαν κάλλο στο σημείο εμβολιασμού, γεγονός που πιθανά προσφέρει δυνατότητες αναγέννησης ολόκληρων φυτών. Αντίθετα, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *A4* ανέπτυξαν ριζικό σύστημα που είχε φαινότυπο αντίστοιχο με αυτό των φυτών αγρίου τύπου και στερούνταν κάλλου. Συνολικά, τα ανωτέρω ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με την ικανότητα του στελέχους *R1000* να επάγει το σχηματισμό διαγονιδιακών ριζών, με το χαρακτηριστικό φαινότυπο των θυσσανωδών ριζών, σε ένα εύρος διαφορετικών ειδών, συμπεριλαμβανομένης της φακής (Foti and Pavli, 2020) και της αλθέας (Toumprou et al., 2023). Σύμφωνα με αναφορές, η ικανότητα αυτή του στελέχους *R1000* αποδίδεται στην υψηλή μολυσματικότητά του που επιτρέπει την αποτελεσματική μεταφορά του Ri T-DNA σε κύτταρα διαφορετικών ξενιστών (Mariashibu et al., 2013).

Ως προς την καταλληλότητα των βακτηριακών στελεχών του *A. rhizogenes* να επάγουν την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στην καλέντουλα, προηγούμενες αναφορές κατέδειξαν την ικανότητα μετασχηματισμού του στελέχους *ATCC13332* (Al-Abasi et al., 2008). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, ο μετασχηματισμός με το στέλεχος *ATCC13332* οδήγησε σε ανάπτυξη κάλλου, προηγμένη ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών, οι οποίες διέφεραν φαινοτυπικά σε σχέση με τις ρίζες αγρίου τύπου, καθώς και αυξημένη σύνθεση σαλικυλικού οξέος. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου ο μετασχηματισμός με το

βακτηριακό στέλεχος *R1000* οδήγησε σε σχηματισμό κάλλου στο σημείο εμβολιασμού και έκπτυξη ριζών με μεγάλο αριθμό διακλαδώσεων. Σε ανάλογο πλαίσιο, στη μελέτη των Dlugosz *et al.* (2013) αναφέρεται πως ο μετασχηματισμός των εκφύτων καλέντουλας επετεύχθη μέσω εμβολιασμού των κοτυληδόνων και του υποκοτυλίου με το βακτηριακό στέλεχος του *A. rhizogenes ATCC15834* που οδήγησε σε ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών περίπου 2 εβδομάδες έπειτα από τον εμβολιασμό. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε διάσταση με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης όπου ο σχηματισμός των νέων ριζών σημειώθηκε 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, γεγονός που παρέχει ενδείξεις σχετικά με την υπεροχή του βακτηριακού στελέχους *R1000* έναντι του στελέχους *ATCC15834*. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη αναφέρεται ότι ο μετασχηματισμός των κοτυληδόνων οδήγησε σε σχηματισμό κάλλου, γεγονός που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Περαιτέρω, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν σημαντικές ενδείξεις σχετικά με την καταλληλότητα της σύστασης τόσο των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία του εμβολίου όσο και των υποστρωμάτων για την επαγωγή των διαγονιδιακών ριζών. Ειδικότερα, ο εμπλουτισμός του θρεπτικού μέσου εμβολιασμού και των υποστρωμάτων επαγωγής ριζών με ακετοσυριγκόνη έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται θετικά με αυξημένη συχνότητα μετασχηματισμού. Από χημικής πλευράς, η ακετοσυριγκόνη αποτελεί φαινολική ένωση, η οποία απαντάται στη φύση και συντίθεται ως απόκριση τραυματισμού των φυτών. Σύμφωνα με μελέτες, η ακετοσυριγκόνη αποτελεί ερέθισμα επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων *vir*, προάγοντας τη μολυσματική δράση των βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Agrobacterium* (Godwin *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα, έχει αναδειχθεί ότι συγκαλλιέργεια του *Agrobacterium* με τραυματισμένα φυτικά κύτταρα ή ιστούς, συμβάλλει θετικά στη μείωση του χρόνου εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και εν γένει στην αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού (Sheikholeslam & Weeks, 1987; Godwin *et al.*, 1991). Ανάλογα ευρήματα σχετικά με τη θετική επίδραση της ακετοσυριγκόνης έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες όπου έγινε χρήση του *A. rhizogenes* ως φορέα μετασχηματισμού (Foti and Pavli, 2020; Toumpou *et al.*, 2023).

Περαιτέρω, τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις αναφορικά με τη θετική επίδραση της αυξημένης ποσότητας σουκρόζης στα θρεπτικά υποστρώματα όπου γίνεται ανάπτυξη των εκφύτων έπειτα από τον εμβολιασμό. Με δεδομένο ότι η σουκρόζη αποτελεί δισακχαρίτη, που αξιοποιείται ως πηγή άνθρακα για το *Agrobacterium*, έχει προταθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωσή της συνεισφέρει θετικά στο μετασχηματισμό μέσω της χρήσης βακτηριακών φορέων. Παρά το γεγονός ότι στόχο της πτυχιακής εργασίας δεν αποτέλεσε η

εστιασμένη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σουκρόζης στα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης των εκφύτων, εκτιμάται ότι η αυξημένη συγκέντρωσή της (3 %) στο υπόστρωμα ριζοβολίας συνέβαλε στην ταχεία και ανάπτυξη αυξημένης βιομάζας ριζών.

Συνολικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ισχυρές ενδείξεις σχετικά με την δυνατότητα του *A. rhizogenes* να επάγει το σχηματισμό διαγονιδιακών ριζών στην καλέντουλα, γεγονός που είναι δυνητικά αξιοποιήσιμο σε διαδικασίες εγκατάστασης καλλιεργειών ριζών με στόχο την παραγωγή βιοδραστικών συστατικών που παράγονται στις ρίζες των φυτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelwahab, S. I., Taha, M. M. E., Taha, S. M. E., & Alsayegh, A. A. (2022). Fifty-year of global research in *Calendula officinalis* L.(1971– 2021): A bibliometric study. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, 2(4), 100059.
- Ak, G., Zengin, G., Ceylan, R., Fawzi Mahomoodally, M., Jugreet, S., Mollica, A., & Stefanucci, A. (2021). Chemical composition and biological activities of essential oils from *Calendula officinalis* L. flowers and leaves. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(5), 554-563.
- Al-Abasi, I. N., Al-Mallah, M. K., & Bashi, B. Z. K. (2022). Engineering of high production of salicylic acid in transgenic hairy roots of Marigold *Calendula officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 13332. *African Journal of Biotechnology*, 21(12), 571-578.
- AshwlayanVD, K. A., & Verma, M. (2018). Therapeutic potential of *Calendula officinalis*. *Pharm Pharmacol Int J*, 6(2), 149-155.
- Aslam, M. S., & Ahmad, M. S. (2016). Worldwide importance of medicinal plants: Current and historical perspectives. *Recent Adv Biol Med*, 2(2016), 909.
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L., & Prosekov, A. (2020). Modern trends in the in vitro production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants. *Molecules*, 25(24), 5805.
- Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., & Jha, S. (2019). A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107405.
- Baker, C. J., Mock, N. M., Whitaker, B. D., Roberts, D. P., Rice, C. P., Deahl, K. L., & Averyanov, A. A. (2005). Involvement of acetosyringone in plant–pathogen recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(1), 130-136.
- Çelik, Ö. (Ed.). (2018). *New Visions in Plant Science*. BoD–Books on Demand.
- Chen, S. L., Yu, H., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese medicine*, 11, 1-10.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2(3), 228-243.

- Dillen, W., De Clercq, J., Kapila, J., Zambre, M., Van Montagu, M., & Angenon, G. (1997). The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. *The Plant Journal*, 12(6), 1459-1463.
- Długosz, M., Wiktorowska, E., Wiśniewska, A., & Pączkowski, C. (2013). Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis* L. *Acta Biochimica Polonica*, 60(3), 467-473.
- Desmet, S., Dhooghe, E., De Keyser, E., Van Huylbroeck, J., Müller, R., Geelen, D., & Lütken, H. (2020). Rhizogenic agrobacteria as an innovative tool for plant breeding: current achievements and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2435-2451.
- Faraz, R., Gokhale, M., & Gothalwa, R. (2020). Hairy root culture through agrobacterium rhizogenes for enhancement of secondary metabolites production in medicinal plants: A review. *Journal of Advanced Microbiology*, 4(1), 45-58.
- Foti, C., Pavli, O.I. (2020). High-Efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transgenic Hairy Root Induction of *Lens culinaris*. *Agronomy*, 10, 1170.
- Gazim, Z.C., Rezende, C.M., Fraga, S.R., Svidzinski, T.I., Cortez, D.A. (2008). Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 61-3.
- Ghorbanpour, M., Hadian, J., Nikabadi, S., & Varma, A. (2017). Importance of medicinal and aromatic plants in human life. *Medicinal plants and environmental challenges*, 1-23.
- Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B., & Newbury, H. J. (1991). The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports*, 9, 671-675.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- Halberstein, R. A. (2005). Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of epidemiology*, 15(9), 686-699.
- Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2019). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*, 1(3), 11-30.
- Kassab, B. B. Z. (2022). Engineering of high production of salicylic acid in transgenic hairy roots of Marigold *Calendula officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 13332. *African Journal of Biotechnology*, 21(12), 571-578.

- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89
- Matvieieva, 2015. Agrobacterium-mediated transformation of Compositae plants. I. construction of transgenic plants and «Hairy» roots with new properties. *Biotechnologia Acta*, 8(1), 19-31.
- Moghaddasi Mohammad, S., & Kashani, H. H. (2012). Pot marigold (*Calendula officinalis*)
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka, M., Tanaka, N., & Yoshida, K. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *Journal of molecular biology*, 307(3), 771-784.
- Padulosi, S., Leaman, D., & Quek, P. (2002). Challenges and opportunities in enhancing the conservation and use of medicinal and aromatic plants. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9(4), 243-267.
- Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345.
- Sheikholeslam, S. N., & Weeks, D. P. (1987). Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 8, 291-298.
- Silva, N. C. C., & Fernandes Júnior, A. J. J. O. V. A. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 16, 402-413.
- Stefanou, P., Baloutas, D., Katsinikas, D., Avraam, E., Kyriazopoulos, A., Parisi, Z., & Arabatzis, G. (2015). Cultivation and production of aromatic plants in Greece: present situation, possibilities and prospects. In *Proceedings of the 8th Panhellenic Rangeland Congress*, At Thessaloniki-Greece.
- Teng, Z. Q., & Shen, Y. (2015). Research progress of genetic engineering on medicinal plants. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 40(4), 594-601.
- Toumpou, C., Georgiadou, E. P., Pavli, O. (2023). Transgenic roots in *Althea* spp.: A potential platform for production of valuable bioactive compounds. 14th International Scientific Agriculture Symposium “AGROSYM 2023”. 5-8 October 2023, Bosnia and Herzegovina.

Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 383-403.

Ying, W., Wen, G., Xu, W., Liu, H., Ding, W., Zheng, L., ... & Wang, X. (2023). *Agrobacterium rhizogenes*: paving the road to research and breeding for woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1196561.

Ματθιόπουλος, Κ. (2016). Γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί: Βασικές τεχνολογικές προσεγγίσεις.

Φερτάκη, Ε. (2011). Αρωματικά φυτά και βιοποικιλότητα.